



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI - UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**MECANISMOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DE RESPOSTA DE
PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) A ALTOS NÍVEIS DE
INFESTAÇÃO DO ÁCARO FITÓFAGO *Schizotetranychus oryzae*
(ACARI: TETRANYCHIDAE)**

Édina Aparecida dos Reis Blasi

Lajeado, fevereiro de 2018

Édina Aparecida dos Reis Blasi

**MECANISMOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DE RESPOSTA DE
PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) A ALTOS NÍVEIS DE
INFESTAÇÃO DO ÁCARO FITÓFAGO *Schizotetranychus oryzae*
(ACARI: TETRANYCHIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, como parte da exigência para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Raul Antonio Sperotto
Coorientadora: Profa. Dra. Joséli Schwambach

Lajeado, fevereiro de 2018

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A. Infestação dos ácaros fitófagos <i>Steneotarsonemus furcatus</i> , <i>Steneotarsonemus spinki</i> , <i>Schizotetranychus oryzae</i> e <i>Oligonychus oryzae</i> em plantas de arroz e sintomas que estas apresentam.....	16
Figura 2A. Modificações fisiológicas e moleculares e mecanismos de defesa induzidos pela infestação de ácaros fitófagos em plantas.....	17
Figura 3A. Modelo esquemático de processos estimulados ou inibidos em plantas de arroz infestadas por <i>Schizotetranychus oryzae</i> , baseado em resultados de proteômica e análises fisiológicas.....	22
Figura 1. Características visuais das folhas de arroz controle e altamente infestadas (LI) com o ácaro <i>Schizotetranychus oryzae</i>	26
Figura 2. Concentração total de clorofila e expressão do gene <i>OsSGR</i> em folhas de arroz controle e altamente infestadas (LI) com o ácaro <i>S. oryzae</i>	27
Figura 3. Coloração histoquímica de O_2^- e H_2O_2 por <i>nitro blue tetrazolium</i> (NBT) e <i>diaminobenzidine</i> (DAB), respectivamente, em folhas de arroz controle e altamente infestadas (LI) com o ácaro <i>S. oryzae</i>	28
Figura 4. Perda de integridade da membrana plasmática em folhas de arroz controle e altamente infestadas (LI) detectada por coloração histoquímica usando o reagente <i>Evans Blue</i>	28

Figura 5. Sobreposição de proteínas de arroz significativamente diferencialmente expressas identificadas em folhas controle (não infestadas) e altamente infestadas (LI) com o ácaro *S. oryzae*.....28

Figura 6. Anotações do *Gene Ontology*. Processos biológicos e funções moleculares para proteínas diferencialmente expressas e exclusivas obtidas de folhas de arroz controle e altamente infestadas (LI) com o ácaro *S. oryzae*.....32

Figura 7. Validação dos dados proteômicos utilizando ensaios enzimáticos de glutationa transferase, fosfatase, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase, protease e peroxidase em folhas de arroz controle e altamente infestadas (LI) com o ácaro *S. oryzae*.....34

Figura 8. Modelo esquemático dos processos de arroz estimulados, inibidos e afetados por *S. oryzae* na infestação inicial (BUFFON et al., 2016) e tardia (este trabalho), com base nos resultados proteômicos e fisiológicos apresentados em ambos os estudos.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de proteínas únicas ou diferencialmente expressas identificadas pelo MudPIT em folhas de arroz controle, com relação à condição de infestação tardia.....29

Tabela 2. Lista de proteínas únicas ou diferencialmente expressas identificadas pelo MudPIT em folhas de arroz com infestação tardia, com relação à condição controle.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJ/JA – ácido jasmônico
ARAF's – arabinofuranosidases
AS/SA – ácido salicílico
BCA – *Bicinchoninic Acid Assay*
CDNB – *1-chloro-2,4-dinitrobenzene*
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
CP's – cisteínas proteinases
DAB – *diaminobenzidine*
EL – *Early Infestation*
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERO's/ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
GLS's – glicosinolatos
GST – Glutathione S-transferase
ha – hectares
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMS – Imposto Sobre Circulação de Mercadorias e Serviços
IG – glicosinolato indol
IRGA – Instituto Riograndense do Arroz
LDH – lactato desidrogenase
LI – *Late infestation*
MeSA – metil-salicilato
MudPIT – *Multidimensional Protein Identification Technology*
NBT – *nitro blue tetrazolium*
O₂⁻ – radical superóxido
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PIB – Produto Interno Bruto
p-NP – p-nitrophenol
PSII – Fotossistema II

PR – relacionada à patogênese

RAF's – *Rapid Alkalinization Factors*

RRI – Resistência Relacionada à Idade

RSA – Resistência Sistêmica Adquirida

RSI/ISR – Resistência Sistêmica Induzida

RS – Rio Grande do Sul

RT-qPCR – *Real Time quantitative PCR*

SGR – *Stay-Green*

SINDARROZ – Sindicato da Indústria do Arroz do Estado do RS

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado

t/ha – toneladas por hectare

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1 Arroz.....	12
3.2 Incidência de ácaros na cultura do arroz: danos visuais e perdas na produção.....	14
3.3 Respostas fisiológicas, moleculares e de defesa geradas por fitófagos em plantas	17
4. ARTIGO	24
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	37
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Todos os anos, cerca de 150 milhões de hectares de arroz (*Oryza sativa* L.) são cultivados em todo o mundo (<http://beta.irri.org/>), gerando uma produção de aproximadamente 715 milhões de toneladas do grão com casca ou 480 milhões de toneladas de arroz polido. Este cereal é a principal fonte de calorias para cerca de 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, representando aproximadamente 50% do suprimento calórico e uma parte considerável da ingestão proteica, sendo assim crítico para a segurança alimentar (MUTHAYYA et al., 2014). Assim, a produção de arroz necessita ser aumentada em 50% até 2030 para atender o crescimento da população consumidora (AHMADI et al., 2014). Isto não será simples, pois se sabe que muitas das oscilações observadas na produção anual do grão são oriundas especialmente de estresses abióticos e bióticos que limitam a germinação, o desenvolvimento e a produtividade da planta (DAMETTO et al., 2015).

O Brasil é o nono maior produtor mundial, além de ser o maior produtor não asiático deste cereal (FAO, 2016). A produção nacional em 2016 foi de 10,6 milhões de toneladas, sendo que o Rio Grande do Sul (RS) se destaca neste cenário, cultivando cerca de um milhão de hectares com arroz irrigado anualmente, que representa 70,8% da produção nacional. Ao todo, o Brasil cultiva dois milhões de hectares com arroz (SOSBAI, 2016; IBGE, 2017).

A média de produtividade de grãos de arroz em casca no Brasil em 2016 foi de 5,3 t/ha, enquanto que a do RS se manteve em torno de 7,0 t/ha (CONAB, 2017). Isso reflete com clareza a importância do arroz aqui produzido, com relação às demais regiões agrícolas brasileiras. A superioridade no rendimento do arroz produzido no RS pode ser atribuída principalmente ao cultivo feito por inundação contínua, já que assim a lavoura não fica dependente das chuvas, como no arroz de sequeiro, o qual depende totalmente de ocorrerem na época certa, pois apenas poucos produtores conseguem fazer uso de irrigação (SINDARROZ, 2007). Além disso, há uma constante busca por cultivares que satisfaçam as necessidades do mercado, com boa qualidade dos grãos e alta produtividade, mais adaptadas aos diferentes sistemas de cultivo (solo seco ou pré-germinado) e também que sejam resistentes ou tolerantes a estresses, tanto abióticos quanto bióticos (SOSBAI,

2016).

Os danos causados por herbívoros às plantas podem ser bastante graves, a curto ou a longo prazo. Existem estimativas de 25% de perdas causadas por pragas nas lavouras de todo o mundo (OERKE, 2006). Conforme a Agrolink (2015) essas perdas podem chegar a US\$ 1,4 trilhão anualmente, ou cerca de 5% do PIB mundial. Isso se deve em grande parte pela introdução de espécies exóticas que não possuem inimigos naturais adequados para combatê-las. No Brasil, a perda anual estimada fica em 7,7%, o que equivale a cerca de 25 milhões de toneladas, representando aproximadamente R\$ 55 bilhões ao ano.

Um fator biótico que vem ganhando destaque nas lavouras de arroz do RS é o ácaro fitófago *Schizotetranychus oryzae* Rossi de Simons, que faz parte da lista de pragas do arroz da Embrapa há algum tempo (EMBRAPA, 1998). Este ácaro foi encontrado em grande número populacional em arrozais da cultivar IRGA 424 (muito utilizada no Estado devido à sua produtividade e qualidade dos grãos) nos municípios de Cachoeirinha e Taquari, causando danos visíveis nas folhas. Entretanto, ainda não se tem estudos quanto aos danos econômicos que ele causa (FERLA; ROCHA; FREITAS, 2013). Sabe-se que os ácaros podem prejudicar as plantas durante todo o seu desenvolvimento, dependendo da espécie e do nível de infestação. No caso do *S. oryzae*, quando se alimenta, introduzindo seus estiletes nas células da planta de arroz, ele provoca lesões que inibem o crescimento, destroem órgãos de reserva e estruturas fotossintéticas, o que acarreta em deficiência na formação dos grãos (SCHMIDT, 2014). O ácaro afeta também o potencial hídrico das células e o metabolismo primário das plantas, especialmente de carboidratos e aminoácidos. A planta, em contrapartida, pode interromper o transporte de nutrientes para impedir a exploração desses por parte do fitófago (NACHAPPA et al., 2013). Ocorre ainda a modulação da expressão gênica, o que pode diminuir o efeito do estresse, e, com o reajustamento das células, desencadear uma proteção ou resistência da mesma (RAMANJULU; BARTELS, 2002; MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

Por estarem constantemente em contato com insetos e patógenos, e por não possuírem sistema imunológico ou capacidade de fugir de seus agressores, as plantas precisaram encontrar, ao longo de sua evolução, outras maneiras para se defender. Estas defesas, quando acionadas, respondem ao que a planta percebe no

ambiente circundante, tornando-se uma adaptação ao estresse (PIETERSE et al., 2005; SHEWRY; LUCAS, 1997; WIT, 2007).

Existe pouca informação referente aos danos causados por ácaros fitófagos em plantas, e o que se tem normalmente está relacionado ao que se pode visualizar na planta durante a infestação, como taxa de crescimento populacional e sintomas de lesão ou mudanças fisiológicas (EVARISTO et al., 2013; JAIMEZ-RUIZ et al., 2015), permanecendo desconhecido o campo molecular relacionado a estes danos.

Atualmente a proteômica vem sendo utilizada para estudar vários organismos, inclusive as plantas. A importância desta técnica se dá, principalmente, por permitir a análise do que acontece após o processo de tradução, como glicosilações/fosforilações de proteínas e interações proteína-proteína. A proteômica permite analisar diversas condições que podem causar crescimento e desenvolvimento anormais nas plantas, como por exemplo, danos causados por estresses abióticos e bióticos (AGRAWAL; RAKWAL, 2011). Nos estudos com estresse biótico é possível também investigar a interação planta-patógeno ou planta-hospedeiro. Nos últimos anos, a proteômica do arroz alcançou enorme progresso no desenvolvimento de métodos altamente eficientes de preparação de amostras e análise de dados de vias fisiológicas e bioquímicas em diferentes estádios de desenvolvimento, em vários tecidos, órgãos, organelas e contra estresses bióticos e abióticos (KIM et al., 2014).

Dessa forma, a identificação dos danos fisiológicos causados pela alta infestação de *S. oryzae*, bem como das respostas moleculares das plantas de arroz, são extremamente importantes para o melhor entendimento da interação ácaro-planta, uma vez que os principais danos que afetam diretamente a produtividade da cultura ocorrem nesta fase. As análises de grande escala, como por exemplo, a proteômica, podem fornecer alvos biotecnológicos com potencial uso para o melhoramento das cultivares de arroz, visando o aumento na resistência a estresses bióticos, como o ácaro *S. oryzae*. A inibição do crescimento populacional deste pode ser importante para evitar danos severos e, conseqüentemente, uma baixa na produtividade no campo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elucidar os mecanismos fisiológicos e moleculares de resposta de plantas de arroz (*O. sativa*) a altos níveis de infestação do ácaro fitófago *S. oryzae*.

2.2 Objetivos específicos

- a) verificar a formação de espécies reativas de oxigênio e perda de integridade da membrana plasmática, em folhas de arroz não infestadas (controle) e altamente infestadas, através de técnicas histoquímicas *in situ*;
- b) quantificar os níveis de clorofila total das folhas de arroz;
- c) identificar proteínas diferencialmente expressas através da técnica de MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*);
- d) relacionar os dados de proteômica através da dosagem da atividade de enzimas encontradas como exclusivas ou diferencialmente expressas;
- e) relacionar os níveis de expressão de RNA e proteína através de PCR em Tempo Real (RT-qPCR).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Arroz

O arroz (*Oryza sativa*) é uma espécie hidrófila, anual, da família Poaceae ou Gramineae, originária de regiões tropicais da Ásia, que vem sendo consumida pelos seres humanos há aproximadamente 5.000 anos (ZHOU et al., 2002). Quanto ao sistema fotossintético, é uma planta C₃ adaptada ao sistema aquático devido à presença de aerênquima no colmo e nas raízes, que possibilita a passagem do oxigênio do ar para a rizosfera (SOSBAI, 2016). Esta planta adaptou-se a diversos ambientes, sendo atualmente cultivada em todos os continentes (exceto na Antártida), o que a tornou um alimento de extrema importância por nutrir grande parte da população mundial (ZHOU et al., 2002; CRUZ et al., 2013).

Quando se refere à área plantada (hectares), o arroz é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, depois do trigo e do milho, que ocupam o primeiro e o segundo lugares, respectivamente. Mas quando se trata de toneladas colhidas, ocupa o segundo lugar, ficando o milho em primeiro e o trigo em terceiro (FAO, 2013). O consumo médio de arroz é de 70 kg/pessoa/ano no mundo. Na Ásia, onde são produzidos 91% deste cereal, o consumo é de para 84 kg/pessoa/ano. Na América Latina o consumo é de 30, e no Brasil 45 kg/pessoa/ano (SOSBAI, 2016).

De acordo com dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (2013), a produção de arroz aumenta em média 1,09% ao ano, confrontando-se com o crescimento da população mundial que é de cerca de 1,32% no mesmo período, o que gera um aumento anual no consumo de aproximadamente 1,27%. Essas pesquisas apontam que o consumo de arroz está crescendo gradativamente, porém, a produção mundial não está acompanhando esse crescimento, evidenciando a importância da criação de estratégias para expandir a produtividade desse grão.

O estado do RS, que é o maior produtor nacional, vem conseguindo manter sua área plantada em um milhão de hectares desde 2005. Por outro lado, o Brasil como um todo vem tendo redução, devido à diminuição do cultivo em terras altas, onde é cultivado o arroz de sequeiro. Apesar de a área cultivada ser mantida no RS, o Estado tem conseguido aumentos gradativos tanto em rendimento, que é simplesmente a quantidade de produto obtido (t/ha), quanto em produtividade que é a quantidade de produto obtido (t/ha) em relação ao número de horas de trabalho (SOSBAI, 2016). Em 2005, a produtividade do RS ficou em torno de 6,0 t/ha, e em 2015 alcançou quase 8,0 (CONAB, 2017). Mesmo com algumas pequenas oscilações, o Estado vem conseguindo manter uma alta produtividade (aproximadamente 7,0 t/ha), juntamente com Santa Catarina, que é o segundo maior produtor nacional (150 mil hectares plantados) (SOSBAI, 2016).

No RS, a estimativa atual é que o arroz represente um valor bruto de produção de 6,3 bilhões de reais, o que significa 3% do ICMS e 1,58% do PIB do Estado. No âmbito social, é importante por poder ser cultivado em pequenas, médias e grandes propriedades. Isso permite que tanto a agricultura familiar, quanto a empresarial, se desenvolva e gere emprego e renda. Na metade sul do RS, por exemplo, o arroz irrigado é a principal atividade econômica, representando cerca de

50% do valor bruto da produção para muitos municípios. Além disso, o Estado é responsável por beneficiar quase 50% do arroz no país, o que mantém diversas indústrias em funcionamento. Um fator que contribuiu para a ampliação do potencial econômico do arroz irrigado foi a possibilidade do uso de rotação de culturas, especialmente pastagens, com o auxílio de irrigação e drenagem (SOSBAI, 2016).

A produção de arroz do RS é caracterizada por grandes lavouras (cerca de 145 ha) com uso de altas tecnologias. Em Santa Catarina, o tamanho médio das lavouras é de 13,5 ha (SOSBAI, 2016) e a rizipiscicultura (cultivo do arroz com a criação de peixes na mesma área) é bastante utilizada, tendo como principais vantagens: maior preservação ambiental devido ao menor uso de agroquímicos (os peixes se alimentam de insetos, parasitas e plantas invasoras) e menor revolvimento do solo. No RS, porém, o controle de pragas é feito predominantemente com uso de produtos químicos, devido, principalmente, ao tamanho das lavouras (SINDARROZ, 2007). Neste sentido, um grande desafio é aliar melhoramento genético e engenharia genética com sistemas produtores sustentáveis, que possam produzir mais e com uma menor utilização de aditivos químicos, sejam fertilizantes ou defensivos. Esta preocupação envolve identificar plantas mais adaptadas a ambientes distintos, bem como mais resistentes especialmente a fatores bióticos, pensando sempre na preservação ambiental.

3.2 Incidência de ácaros na cultura do arroz: danos visuais e perdas na produção

Os ácaros pertencem ao Filo Arachnida (no qual se encontram também as aranhas, escorpiões e pseudo-escorpiões), e ao Subfilo Chelicerata. Quanto à forma de alimentação, podem ser saprófagos, coprófagos, necrófagos, parasitos, predadores ou fitófagos (PEROTTI et al., 2009).

Os ácaros passaram a ter evidência como pragas de culturas depois da Segunda Guerra Mundial, especialmente por terem seus inimigos naturais muitas vezes extintos, devido ao uso de pesticidas. O uso de monoculturas e o desmatamento também causam a diminuição da biodiversidade e favorecem o estabelecimento de espécies-praga (MORAES, 1991; MYERS, 1996).

Existem poucos trabalhos que relatam ácaros em plantas de arroz no RS. O

que mais se conhece são ácaros associados a outras culturas (LORENZATO et al., 1986; LORENZATO, 1987; LORENZATO et al., 1993; FERLA; MORAES, 1998; FERLA; MARCHETTI; SIEBERT, 2005; FERLA; MARCHETTI; GONÇALVES, 2007). Porém, já se sabe que eles promovem perdas na produtividade do arroz (BLASI et al., 2015; BUFFON et al., 2016), e que podem danificar as plantas durante todo o desenvolvimento, dependendo da espécie de ácaro e do nível de infestação.

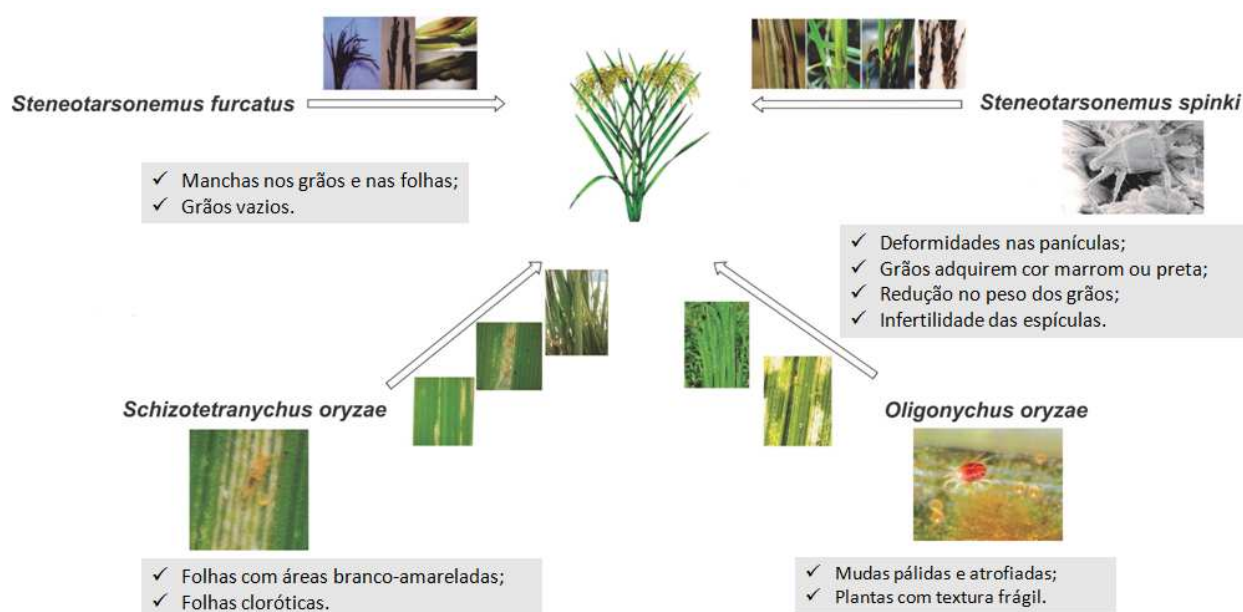
Entre os ácaros fitófagos que causam danos à cultura do arroz no Brasil destacam-se os das famílias Tarsonemidae e Tetranychidae. Dentre os tarsonemídeos, uma espécie importante é o *Steneotarsonemus furcatus* (De Leon) encontrado no Mato Grosso do Sul, que causa manchas nas folhas e nos grãos em formação. As panículas atacadas não se desenvolvem normalmente, resultando em grãos vazios (NAVIA; MENDES; OCHOA, 2006). Em 2005, em uma plantação do genótipo Primavera, foi observada redução de 30 a 50% na produção devido ao estresse causado por este ácaro (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

O tarsonemídeo *Steneotarsonemus spinki* Smiley causou danos significativos a plantações de arroz na China e em Taiwan nos anos 70. Em seguida, nos anos 80, apareceu como importante praga de arroz em toda a Ásia tropical (KARMAKAR, 2008). Já na década de 90 foi encontrado em plantações da República Dominicana e de Cuba (FERLA; ROCHA; FREITAS, 2013), sendo que neste país as maiores populações do ácaro apareceram na bainha da folha-bandeira, na fase próxima à colheita, e em variedades de ciclo curto (ALMAGUEL et al., 2000). Mais tarde, em 2007, foi encontrado também nos EUA. As panículas das plantas atacadas tornam-se deformadas e a superfície dos grãos adquire coloração marrom ou preta. Enquanto que a superfície interna da bainha das folhas e a casca do grão adquirem tom castanho (CHO et al., 1999). Como consequência, reduções de até 90% na produção de lavouras de arroz têm sido relatadas (HUMMEL et al., 2009).

Ácaros da família Tetranychidae já foram relatados na cultura do arroz, em diversas regiões do mundo, causando grandes danos econômicos (KARMAKAR, 2008). Um deles é o ácaro *Oligonychus oryzae* Hirst, considerado uma das mais importantes pragas que atacam arrozais na Ásia, especialmente na Índia, causando grandes perdas na produção (RADHAKRISHNAN; RAMARAJU, 2009). As plantas infestadas ficam atrofiadas e pálidas, com folhas bastante frágeis (NIAZI; SINGH, 2001).

Ainda dentre os tetraniquídeos destaca-se o *Schizotetranychus oryzae*, com incidência na Argentina (Corrientes) e no Brasil, incluindo Rio Grande do Sul (FLECHTMANN, 1985), São Paulo (ROSSETO et al., 1971), Rio de Janeiro e Espírito Santo (BARCELLOS et al., 1979). Este ácaro já era considerado por Moraes (1991) como uma praga em potencial para as lavouras de arroz. Vistas à distância, as plantas atacadas aparentam toxicidade causada por herbicidas (EMBRAPA, 2017) ou deficiência de nitrogênio, e são visíveis pequenas áreas branco-amareladas e alongadas nas folhas, semelhante a viroses. Estas áreas aparecem em ambas as faces da folha e são compostas por colônias de ácaros em vários estádios de desenvolvimento, que ali se encontram escondidos e amparados pela fina teia que tecem (BARCELLOS et al., 1979). As folhas infestadas se tornam cloróticas, conforme a infestação avança. *S. oryzae* é o principal ácaro fitófago encontrado nas plantações de arroz no Rio Grande do Sul (FERLA; ROCHA; FREITAS, 2013). Surto desse ácaro são observados durante períodos de seca e calor, comprometendo a produtividade dos grãos (EMBRAPA, 2017). As principais espécies de ácaros do arroz, bem como os principais danos que causam, são apresentados na Figura 1A.

Figura 1A - Infestação dos ácaros fitófagos *Steneotarsonemus furcatus*, *Steneotarsonemus spinki*, *Schizotetranychus oryzae* e *Oligonychus oryzae* em plantas de arroz e sintomas que estas apresentam.



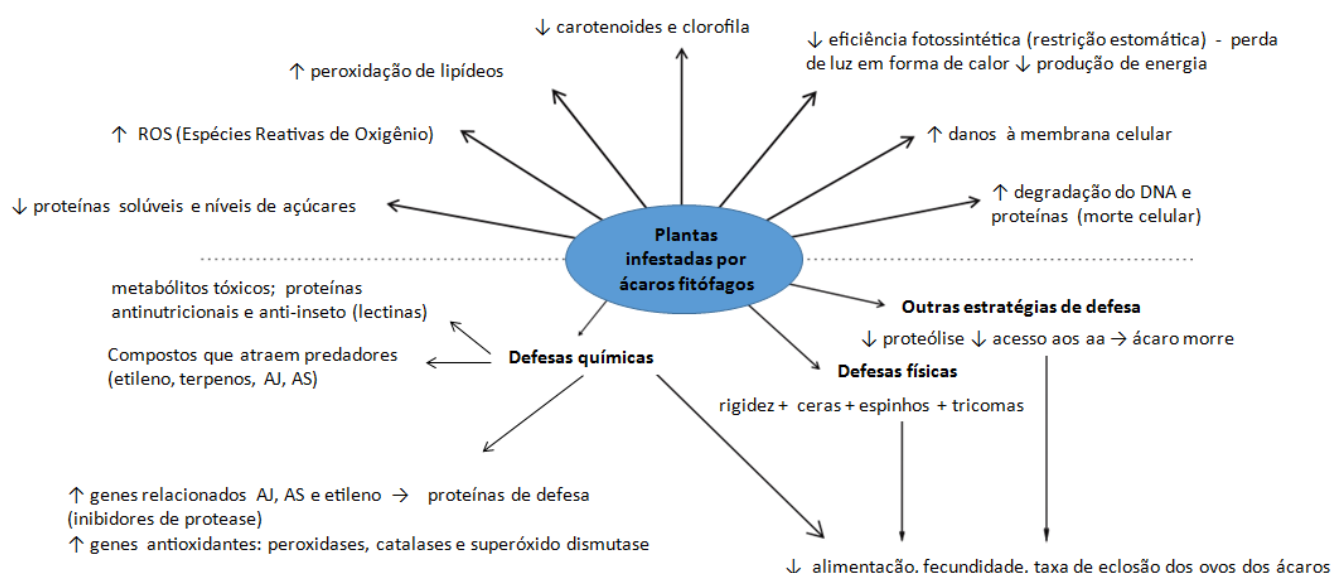
Fonte: Blasi et al. (2015) modificada.

3.3 Respostas fisiológicas, moleculares e de defesa geradas por fitófagos em plantas

Existe pouca informação relacionada aos mecanismos de defesa de plantas de arroz (monocotiledônea) contra artrópodes. A maioria dos trabalhos envolve estudos com dicotiledôneas como, por exemplo, o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (BALMER; PLANCHAMP; MAUCH-MANI, 2013). Para uma revisão completa sobre o assunto, checar Blasi et al. (2015) que apresenta uma visão geral dos principais danos (fisiológicos e moleculares) causados pelos ácaros, bem como as estratégias de defesa adotadas pelas plantas, o que pode ser visto na Figura 2A.

Mesmo a figura não sendo baseada na cultura do arroz, é bem provável que grande parte dos processos nela apresentados sejam comuns e conservados entre as plantas, quando se trata de mecanismos de defesa acionados contra pragas (WU et al., 2014).

Figura 2A - Modificações fisiológicas e moleculares e mecanismos de defesa induzidos pela infestação de ácaros fitófagos em plantas. AJ: ácido jasmônico; AS: ácido salicílico.



Fonte: Blasi et al. (2015) modificada.

Sabe-se que as respostas iniciais das plantas são reguladas por de fitohormônios, enquanto que as tardias envolvem tipicamente a síntese de

fitoalexinas e metabólitos de defesa secundários (AGUT et al., 2015). Interessantemente, para responder de maneira eficaz contra o ataque de artrópodes, as plantas contam com receptores que identificam moléculas elicitoras sintetizadas pelos agressores, além de agregados de ácidos graxos-aminoácidos, presentes na secreção oral de artrópodes herbívoros (GILARDONI et al., 2010). Tais moléculas são indispensáveis no desenvolvimento de uma resposta específica da planta contra o que a está atacando (HALITSCHKE et al., 2003). Assim, a indução de defesas nas plantas depende da habilidade delas em identificar e reconhecer seus agressores, e ainda varia com a espécie herbívora e o nível de infestação ou tempo de ataque (KANT et al., 2004; WU; BALDWIN, 2009; DE OLIVEIRA et al., 2016). Ainda como estratégia de defesa, as plantas liberam ácido linoleico a partir de lipídios de membrana, que é transformado em ácido jasmônico, e este, por sua vez, ativa a transcrição de genes que levam a um aumento na produção de compostos direcionados à defesa (HEIL; BOSTOCK, 2002; BUFFON et al., 2016).

Os compostos que as plantas produzem podem modificar o comportamento dos ácaros fitófagos e lhes causar intoxicação. Porém, estes seres se adaptam muito facilmente a tais compostos, e as plantas necessitam produzir novas substâncias que estes não conheçam (DERMAUW et al., 2012). Um processo conhecido como "*priming*" permite que as plantas, uma vez atacadas, se tornem mais sensíveis e mais ágeis na resposta a novos estresses bióticos (HEIL; BOSTOCK, 2002). Este "*priming*" pode ser desencadeado também por indutores químicos, como o ácido β -aminobutírico (JAKAB et al., 2001). O "*priming*" é um tipo de defesa adquirida ao longo do tempo pelas plantas, que apesar de ainda não ser totalmente claro, já se sabe que é caracterizado pela ativação de proteínas sinalizadoras, fatores de transcrição e genes de defesa. O problema deste mecanismo é que tem gasto de energia e pode ocasionar perdas na produtividade (WORRAL et al., 2012).

De acordo com Mao et al. (2017), há também outro mecanismo que embora seja conhecido apenas nas interações planta-patógeno, não está totalmente descartado para interações inseto-planta. Com o envelhecimento as plantas podem desenvolver esta estratégia de defesa distinta, em grande parte dependente de ácido salicílico, chamada RRI (Resistência Relacionada à Idade) que lhes propicia, se não resistência, menos suscetibilidade ao ataque de patógenos. Quando a RRI é

observada, muitos genes com possíveis funções de defesa são expressos durante o desenvolvimento final da planta, mesmo durante a senescência, como por exemplo, genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR) (KUS et al., 2002).

Para defender-se de artrópodes, as plantas utilizam estratégias físicas ou químicas (ZHANG; LUBBERSTEDT; XU, 2013). As defesas físicas têm por função restringir o acesso dos fitófagos aos tecidos vegetais, dificultando sua alimentação, e são caracterizadas por rigidez dos tecidos e presença de ceras, espinhos e tricomas (VET, 1999). As defesas químicas envolvem, num primeiro momento, a produção de metabólitos tóxicos para o agressor, e posteriormente a síntese de proteínas que podem, ao longo da evolução da planta, criar defesas físicas, como maior densidade de tricomas (WORRAL et al., 2012). Ocorre ainda uma alteração na expressão de lectinas, que são proteínas “anti-inseto” produzidas pelas plantas, e que têm capacidade de diminuir a população da praga (MICHIELS; VAN DAMME; SMAGGHE, 2010). As plantas podem produzir também metabólitos secundários, que reduzem sua digestibilidade para uma vasta gama de possíveis consumidores (STRAUSS; ZANGERL, 2002).

As estratégias de defesa das plantas podem ser classificadas ainda como constitutivas, que elas apresentam mesmo não sendo atacadas; ou induzidas, que ocorrem apenas depois do ataque e tem como alvo direto o agressor (FADINI et al., 2004). Depois da exposição ao agente indutor, são acionados na planta os mecanismos de Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI), desencadeando ações de defesa em diversos locais, e não somente onde ocorre a agressão (CONRATH et al., 2006).

Na RSA ocorre a liberação de um sinal no local onde está acontecendo a infestação, gerando necrose e espalhando este sinal para outras regiões da planta, o que vai induzir mecanismos de defesa que irão protegê-la em agressões posteriores. Já na RSI, que é a estratégia mais importante contra os ácaros fitófagos, não ocorre necrose, mas a planta é induzida a uma proteção sistêmica. Alguns exemplos de defesa induzida são modificações na parede celular, produção de fitoalexinas (WARD et al., 1991) e aumento na expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com patogênese (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). As plantas podem ainda produzir toxinas repelentes e anti-nutricionais, ou liberar compostos orgânicos voláteis que atraem predadores do fitófago que as ataca. Esses compostos são de

extrema importância, pois enquanto ajudam a planta atacada, também colocam em alerta as demais plantas que a cercam, as quais ficam preparadas para um possível ataque (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

Usando uma abordagem metabolômica e transcriptômica, Kant et al. (2004) mostraram que folhas de tomate ativam suas respostas de defesa, como inibidores de protease e genes envolvidos com síntese de ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno, já no dia seguinte à infestação por um ácaro fitófago (*Tetranychus urticae*). Mesmo com um aumento na expressão de enzimas que sintetizam mono e diterpenos também no primeiro dia, a emissão de terpenoides voláteis só aumentou no quarto dia, o que acarretou também em uma maior preferência olfativa de ácaros predadores (*Phytoseiulus persimilis*) pelas plantas infestadas. Isso significa que os tomateiros apenas disparam suas defesas indiretas, que são os compostos voláteis, como complemento da defesa direta ao ataque dos ácaros fitófagos.

Já se sabe que as vias de defesa induzidas por ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ) são as mais comuns nas plantas (AGUT et al., 2015) e que essas defesas resultam em alterações morfológicas e síntese de metabólitos secundários, que causam diminuição no desempenho dos herbívoros (ALBA et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2016). Os genes relacionados à biossíntese desses dois compostos, bem como do etileno, também codificam proteínas de defesa como glucanases, quitinases, proteases, polifenol oxidases, além de inibidores de protease, que irão diminuir os danos sofridos pela planta. Além disso, proteínas que atuam como enzimas e estão envolvidas com detoxificação celular, tais como peroxidases, catalases e superóxido dismutase, também têm seus genes ativados (GRINBERG et al., 2005; NACHAPPA et al., 2013; CZERNIEWICZ et al., 2017).

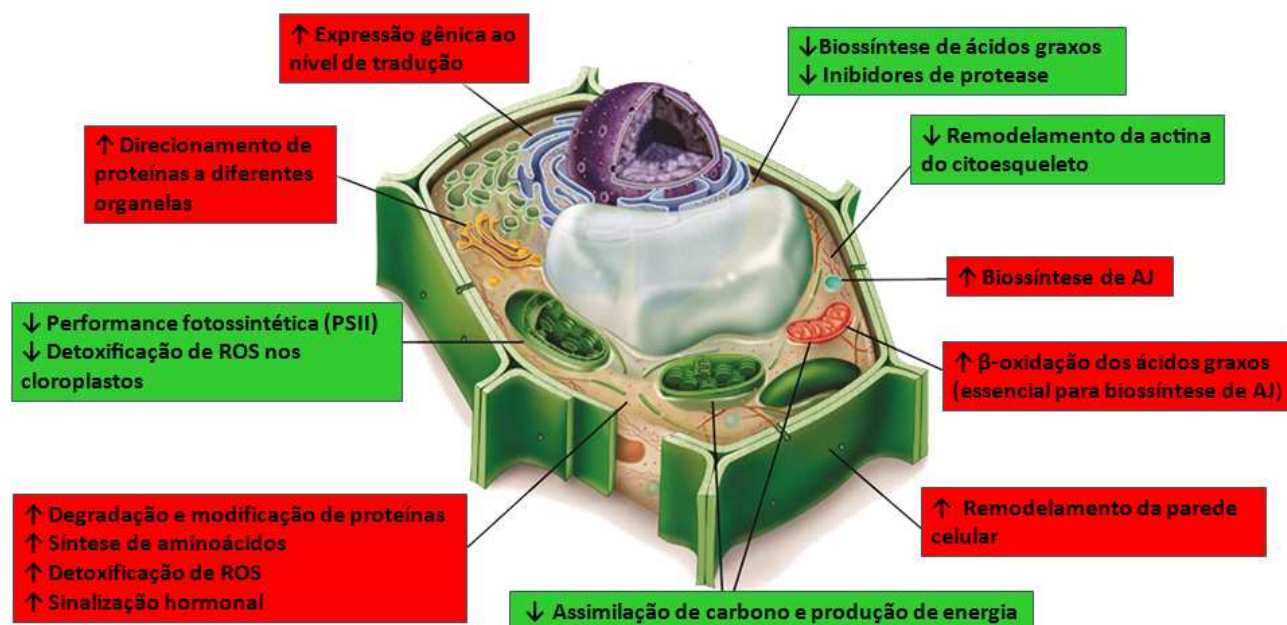
Estas enzimas são extremamente importantes para combater as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's), que são subprodutos oriundos do metabolismo aeróbico em diversas partes da célula (mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos, membranas celulares), e por isso são comuns em animais e vegetais. As ERO's também atuam como importantes moléculas de sinalização, essenciais na mediação das respostas de adaptação a estresses abióticos e bióticos (MITTLER et al., 2011).

Porém, quando há uma produção excessiva de ERO's (chamado de estresse oxidativo) devido, por exemplo, à infestação de ácaros, pode ocorrer déficit de biomassa vegetal, bem como diminuição da taxa fotossintética, em função das

restrições estomáticas (SCHMITT et al., 2014). Essa restrição é oriunda do fechamento dos estômatos devido ao dano causado pelos ácaros às células do mesófilo foliar (FADINI et al., 2004). O estresse oxidativo pode ainda inativar proteínas do aparato fotossintético, levando à perda de energia na forma de calor, o que compromete diretamente a produção energética da planta. Além disso, podem ocorrer danos à membrana celular, aumento da degradação proteica e do DNA, e por fim, morte celular (SCHMITT et al., 2014). A diminuição na quantidade de proteínas solúveis (devido à degradação) e a queda na concentração de carboidratos levam a uma redução do crescimento das plantas infestadas (PETANOVIC; KIELKIEWICZ, 2010).

Buffon et al. (2016) demonstraram que quatro proteínas relacionadas com detoxificação celular são expressas apenas em folhas de arroz com infestação inicial do ácaro *S. oryzae*, em comparação com as folhas controle (não infestadas). Mostraram também que proteínas relacionadas com a fotossíntese são inibidas ou mesmo não expressas nas folhas infestadas. Além disso, alguns parâmetros fotossintéticos apresentaram queda nas plantas infestadas, indicando uma redução da capacidade fotossintética. Proteínas relacionadas com degradação e modificação proteica, metabolismo de aminoácidos e de purinas e pirimidinas também foram expressas unicamente nas folhas infestadas. Uma visão geral dos danos moleculares e fisiológicos causados pela infestação inicial de ácaros *S. oryzae*, é apresentada na Figura 3A.

Figura 3A - Modelo esquemático de processos estimulados (em vermelho) ou inibidos (em verde) em plantas de arroz levemente infestadas por *Schizotetranychus oryzae*, baseado em resultados de proteômica e análises fisiológicas. AJ: ácido jasmônico; PSII: fotossistema II. ROS: espécies reativas de oxigênio.



Fonte: Buffon et al. (2016) modificada.

Quando a planta se aproxima do término de seu ciclo de vida, tende automaticamente a se encaminhar para um processo de morte ou senescência, que é o último estágio do desenvolvimento das folhas. Nele ocorrem várias modificações fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Muitas macromoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos são hidrolisadas, ocorrendo a desmontagem de mitocôndrias e núcleos, seguindo-se de morte celular. Isso funciona como um processo de reciclagem de materiais, mas quando ocorre prematuramente, é prejudicial, pois encurta o estágio de crescimento das culturas e é desfavorável à produção agrônômica (MAO et al., 2017).

A principal característica da senescência foliar é o amarelecimento, que é um marcador visível da degradação de macromoléculas como, por exemplo, a clorofila que ocorre devido à degeneração dos cloroplastos (LIANG et al., 2014). O processo de amarelecimento que ocorre nas folhas senescentes é coordenado pela família de genes STAY-GREEN (SGR). Os produtos desses genes, as proteínas SGR, atuam como os principais reguladores da degradação da clorofila. Há uma possível

associação funcional de proteínas SGR com dissociação de complexos clorofila-proteína nos cloroplastos, o que torna as clorofilas suscetíveis à degradação (SMOLIKOVA et al., 2017).

Embora se saiba que a senescência da folha é controlada principalmente pela idade da planta, o início e a progressão deste processo também são influenciados por uma série de fatores endógenos e externos. Entre os fatores endógenos estão os fitohormônios, concentração de metabólitos e estado da fotossíntese. Já os fatores externos referem-se aos estresses abióticos e bióticos (SAKURABA et al., 2015). Insetos como pulgões podem usar o mesmo local de alimentação por horas ou dias, modulando a expressão gênica da planta hospedeira para direcionar nutrientes a este local. Em contrapartida, a senescência prematura da folha infestada pode ser utilizada pela planta como estratégia de defesa, pois quando densamente colonizada, ela se torna senescente deixando de fornecer os nutrientes ao fitófago, o que prejudica seu desenvolvimento e multiplicação (PEGADARAJU et al., 2005).

Mesmo assim, se sabe que a ocorrência de senescência prematura é um dos principais fatores que influenciam a estabilidade do rendimento no arroz (LIANG et al., 2014), e em outras culturas também (MAO et al., 2017). Assim, conhecendo mais profundamente as respostas que as plantas desenvolvem quando atacadas por fitófagos, podem ser encontradas maneiras de fazer com que estas se tornem resistentes ou, ao menos, mais tolerantes aos danos que sofrem.

4 ARTIGO

Título: High infestation levels of *Schizotetranychus oryzae* severely affects rice metabolism.

Revista: *Journal of Plant Physiology*.

JCR: 3,121.

Qualis CAPES: A2 em Biotecnologia.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jplph

Research Paper

High infestation levels of *Schizotetranychus oryzae* severely affects rice metabolism

Édina A.R. Blasi^{a,1}, Giseli Buffon^{a,1}, Angie G.S. Rativa^b, Mara C.B. Lopes^c, Markus Berger^d,
Lucélia Santi^d, Mathieu Lavallée-Adam^{e,f}, John R. Yates III^f, Joséli Schwambach^g,
Walter O. Beys-da-Silva^d, Raul A. Sperotto^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), University of Taquari Valley – UNIVATES, Lajeado, RS, Brazil

^b Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), University of Taquari Valley – UNIVATES, Lajeado, RS, Brazil

^c Setor de Melhoramento Genético, Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), Cachoeirinha, RS, Brazil

^d Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE – HCPA/UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^e Ottawa Institute of Systems Biology and Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

^f Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

^g Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
MudPIT
Oxidative stress
Protease inhibitor
Rice infestation
Senescence
Shotgun proteomics
Translation

ABSTRACT

High levels of *Schizotetranychus oryzae* phytophagous mite infestation on rice leaves can severely affect productivity. Physiological characterization showed that *S. oryzae* promotes a decrease in chlorophyll concentration and the establishment of a senescence process in rice leaves. Late-infested leaves also present high levels of superoxide radical and hydrogen peroxide accumulation, along with high levels of membrane integrity loss, which is indicative of cell death. To better understand the rice molecular responses to high levels of mite infestation, we employed the Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) approach to identify differentially expressed proteins. We identified 83 and 88 proteins uniquely present in control and late-infested leaves, respectively, along with 11 and one proteins more abundant in control and late-infested leaves, respectively. *S. oryzae* infestation induces a decreased abundance of proteins related to translation, protease inhibition, and photosynthesis. On the other hand, infestation caused increased abundance of proteins involved in protein modification and degradation. Our results also suggest that *S. oryzae* infestation interferes with intracellular transport, DNA structure maintenance, and amino acid and lipid metabolism in rice leaves. Proteomic data were positively correlated with enzymatic assays and RT-qPCR analysis. Our findings describe the protein expression patterns of late-infested rice leaves and suggest several targets which could be tested in future biotechnological approaches aiming to avoid the population increase of phytophagous mite in rice plants.

1. Introduction

Rice is the staple food for over half of the world's population. Approximately 715 million metric tons of paddy rice, which generates about 480 million metric tons of milled rice, are produced annually in over a hundred countries (Muthayya et al., 2014). Rice is the primary source of calorie intake for an estimated 3.5 billion people worldwide. This is especially the case in the developing world, where it accounts for approximately 50% of the dietary caloric supply and a substantial part of the protein intake, being therefore critical for food security (Muthayya et al., 2014). For this reason, rice production faces the

challenge to be enhanced by 50% by year 2030 to meet the growth of the population in rice-eating countries (Ahmadi et al., 2014). This is definitely not an easy task, since the oscillations observed in annual production of this culture derive mainly from abiotic and biotic stresses, which limit plant germination, development, and productivity (Lim et al., 2013; Dametto et al., 2015). The estimates for the potential losses caused by animal pests are around 25% worldwide (Oerke, 2006). One of the main reasons for losses in rice productivity is phytophagous mite infestation (Blasi et al., 2015; Buffon et al., 2016) that can damage rice plants during its entire development, depending on the mite species and infestation level.

Abbreviations: GO, gene ontology; PSII, photosystem II

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), University of Taquari Valley – UNIVATES, Lajeado, RS, Brazil.

E-mail address: rasperotto@univates.br (R.A. Sperotto).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2017.10.005>

Received 19 June 2017; Received in revised form 13 October 2017; Accepted 16 October 2017

Available online 28 October 2017

0176-1617/© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

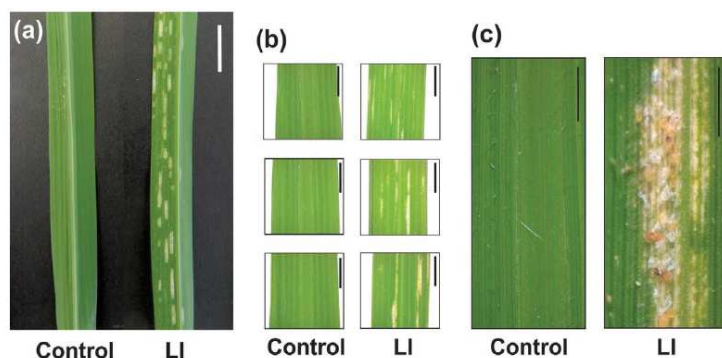


Fig. 1. Visual characteristics of leaves from control and late-infested (LI) leaves (a). Detailed view of these leaves under stereomicroscope (b and c). Bars indicate 1 cm in (a), 0.5 cm in (b) and 0.25 cm in (c).

Phytophagous mites of the Tarsonemidae (*Steneotarsonemus furcatus* De Leon and *Steneotarsonemus spinki* Smiley) and Tetranychidae (*Schizotetranychus oryzae* Rossi de Simons and *Oligonychus oryzae* Hirst) families are frequently found infesting rice culture as reviewed by Blasi et al. (2015). The spider mite *Schizotetranychus oryzae* (Acari: Tetranychidae) was first found in Argentina, and has been reported in rice plantations in Brazil and other South American countries (Ferla et al., 2013). Rice leaves infested with *S. oryzae* may present yellowish white elongated areas on the upper side of the leaves that corresponds to mite colonies in different stages of development. These colonies are located on the lower surface of the leaves (Buffon et al., 2016). In order to defend themselves from herbivore attacks, plants employ a wide range of induced defenses, including mostly jasmonic acid- and salicylic acid-dependent (Agut et al., 2015). These defenses result in morphological changes and synthesis of secondary metabolites that cause a decrease in herbivore performance (Alba et al., 2011; de Oliveira et al., 2016). The induction of these plant defenses depends on the ability of the plant to identify and recognize its attackers, and varies with the herbivore species and infestation level or the amount of time since the attack (Kant et al., 2004; Wu and Baldwin, 2009; de Oliveira et al., 2016). For example, in early attack stage plant responses are regulated through phytohormones, whereas late stage responses typically involve the synthesis of phytoalexins and secondary defensive metabolites (Agut et al., 2015). Rice responses to early *S. oryzae* infestation include down-regulation of photosynthetic performance, carbon assimilation and energy production, fatty acid biosynthesis and actin cytoskeleton remodeling. On the other hand, gene expression at the translational level, protein partitioning to different organelles, protein modification and degradation, β -oxidation of fatty acids (essential to jasmonic acid biosynthesis) and cell wall remodeling are up-regulated in response to early infestation (Buffon et al., 2016). It is important to highlight that a small/limited number of mites on rice plants can induce all of these molecular effects. In late stages, where there is a substantial increase in herbivore activity promoted by a larger number of mites infesting rice plants, the responses are still completely unknown.

Even though mite infestations in rice plantations can cause drastic yield reductions of up to 90% (Hummel et al., 2009), most of the plant-mite interaction studies have been limited to the visual effects of the infestation (population growth rate and injury symptoms) or physiological changes (Evaristo et al., 2013; Jaimez-Ruiz et al., 2015). Thus, the molecular mechanisms specifically elicited by mite infestation in rice plants remain virtually unexplored. In recent years, rice proteomics has achieved tremendous progress in development of highly efficient sample preparation methods and physiological and biochemical pathway data analysis under different developmental stages, in various tissues, organs, and organelles, and against biotic and abiotic stresses (Kim et al., 2014). Previously, we detected differentially expressed proteins in rice leaves after *S. oryzae* phytophagous mite early infestation (Buffon et al., 2016). The understanding of rice response to an

intense parasitic activity promoted by *S. oryzae* in late infestation on rice leaves is important since the main damages directly affecting rice productivity occurs in this stage. In this work, we focused on the physiological and molecular alterations in rice leaves exposed to high levels of *S. oryzae* infestation, hypothesizing that we could use proteomic approach to identify potential targets to avoid the population increase of phytophagous mite in rice plants. Our findings will be helpful for future biotechnological and molecular breeding efforts that aim to promote mite resistance in rice leaves.

2. Materials and methods

2.1. Plant growth and mite infestation conditions

Plant growth and mite infestation conditions were performed according to Buffon et al. (2016). In all the experiments, we analyzed healthy (control) and late-infested leaves (LI, 60 days after infestation, containing about 177.8 ± 22.4 mites per leaf) (Fig. 1). It is important to highlight that IRGA 424 cultivar is not affected by the means of plant height and tiller number, but some leaves present high infestation levels after only 30 days, and the grain yield is reduced significantly (data not shown).

2.2. Total chlorophyll concentration

Samples containing 100 mg of leaves from rice plants submitted to control or infested conditions were ground in liquid nitrogen and chlorophyll extracted in 85% (v/v) acetone. Chlorophyll *a* and *b* were quantified by measuring absorbance at 663 and 645 nm and the concentrations calculated according to Ross (1974).

2.3. In situ histochemical localization of O_2^- and H_2O_2

In situ accumulation of O_2^- and H_2O_2 was detected by histochemical staining with nitro blue tetrazolium (NBT) and diaminobenzidine (DAB), according to Shi et al. (2010) with minor modifications. For O_2^- detection, leaves of control and late-infested plants were excised and immersed in a 1 mg ml^{-1} solution of NBT in 10 mM phosphate buffer (pH 7.8) at room temperature. Immersed leaves were illuminated for 2 h until appearance of dark spots, characteristic of blue formazan precipitates. For localization of H_2O_2 , another set of leaves was sampled and immersed in DAB solution (1 mg ml^{-1} , pH 3.8) in 10 mM phosphate buffer (pH 7.8), and incubated at room temperature for 8 h in the light until brown spots were visible, which are derived from the reaction of DAB with H_2O_2 . For both staining methods, leaves were bleached in boiling concentrated ethanol to visualize the blue and brown spots, which were kept in 70% ethanol for taking pictures with a digital camera coupled to a stereomicroscope.

2.4. Detection of cell death by loss of plasma membrane integrity

To determine changes in cell viability by *S. oryzae* late infestation, excised leaves were immersed for 5 h in a 0.25% (w/v) aqueous solution of Evans Blue (Romero-Puertas et al., 2004). Leaves were discolored in boiling concentrated ethanol to develop the blue precipitates, which correspond to the localization of dead cells, followed by photo documentation with a digital camera coupled to a stereomicroscope.

2.5. Protein extraction and Rubisco depletion

Protein extraction and determination of protein concentration were performed according to Buffon et al. (2016), using Plant Total Protein Extraction Kit (Sigma-Aldrich) and BCA assay, respectively. Krishnan and Natarajan (2009) method was used for depletion of Rubisco proteins.

2.6. Sample preparation for mass spectrometry

Sample preparation for mass spectrometry was performed according to Buffon et al. (2016), using approximately 100 µg of Rubisco depleted protein extracts as starting material.

2.7. MudPIT and mass spectrometry conditions

MudPIT and mass spectrometry conditions were the same used by Buffon et al. (2016). Three biological replicates were analyzed for both control and late-infested samples using an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA).

2.8. Data analysis

Data analysis was performed according to Buffon et al. (2016). In brief, PatternLab software (Carvalho et al., 2012) was used to identify unique and differentially expressed proteins (through the analysis of spectral counts) in both tested conditions. To be considered differentially expressed, proteins should have q -value < 0.05 (5% FDR) and fold change > 2.0. Approximate Area Proportional Venn diagram (A-APVD) module of PatternLab was used to highlight the number of unique proteins in each sample. We also analyzed the proteins using Blast2GO tool (<http://www.blast2go.org> – Conesa et al., 2005) and B2G Kegg maps.

2.9. Validation of proteomic data through enzymatic assays

Glutathione S-transferase (GST) activity was measured using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Sigma, USA) as substrate. Phosphatase activity was measured by the rate of p -nitrophenol (p -NP) production. Lactate dehydrogenase activity (LDH) was measured based on its ability to reduce pyruvate using NADH as a cofactor, generating lactate and NAD⁺. Aminotransferase activity was measured based on the transfer of amino groups of aspartate to α -ketoglutarate, leading to formation of glutamate and oxaloacetate. Protease activity was measured based on the production of p -nitroaniline. Reaction conditions were the same as used previously (Buffon et al., 2016).

The peroxidase activity was determined by measuring the absorbance at 470 nm of tetraguaiacol produced by the reaction between 0.05 M guaiacol solution and 10.3 mM hydrogen peroxide solution in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 at 25 °C. The increase in absorbance at 470 nm was monitored for 5 min. One activity unit was defined as the amount of enzyme that causes an increase of 0.001 in absorbance per hour.

All enzymatic assays were performed in triplicates, with results obtained from at least two separate experiments. RT-qPCR analyses were also used to correlate and validate the proteomic data at the RNA

level, as described below.

2.10. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from rice leaves using NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany). cDNA was prepared using the SMART PCR cDNA Synthesis Kit by Clontech Laboratories (Mountain View, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (M-MLV, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using 1 µg of total RNA.

2.11. Quantitative RT-PCR and data analysis

RT-qPCRs were carried out in a StepOne Real-Time Cycler (Applied Biosystems). All primers (listed in Supplementary Table 1) were designed to amplify 100–150 bp of the 3'-UTR of the genes and to have similar Tm values (60 °C \pm 2). RT-qPCR reactions and gene expression evaluations were performed according to Buffon et al. (2016). *OsUBQ5* gene expression was used as an internal control to normalize the relative expression of the tested genes (Jain et al., 2006). Each data point corresponds to three biological and four technical replicate samples.

The expression of a senescence marker gene (*Staygreen* gene, *OsSGR*, a chloroplast protein which regulates chlorophyll degradation by inducing LHClI disassembly through direct interaction; Park et al., 2007) was also analyzed in control and LI leaves.

2.12. Statistical analysis

Data generated from enzymatic activities and RT-qPCR were analyzed statistically using the Student's two-tailed t -test (p -value \leq 0.05, 0.01, and 0.001) using SPSS Base 21.0 for Windows (SPSS Inc., USA).

3. Results and discussion

3.1. Physiological characterization of late-infested rice leaves

Rice leaves highly infested with *Schizotetranychus oryzae* showed a decrease in total chlorophyll concentration (Fig. 2a), which is indicative of a well-established senescence process. Such hypothesis was confirmed by the higher expression of the senescence marker *OsSGR* gene (Park et al., 2007) in late-infested leaves when compared to control (Fig. 2b). It is important to highlight that *OsSGR* expression on early-infested leaves was at the same level of control leaves (data not shown), suggesting that a high *S. oryzae* population is needed to trigger the endogenously degenerative senescence process that ultimately leads to plant death (Yoshida, 2003). A reduction in total chlorophyll

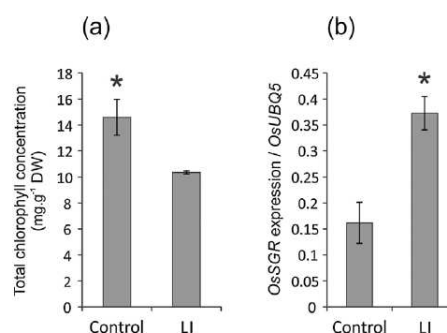


Fig. 2. Total chlorophyll concentration (a) and *OsSGR* expression (b) in rice leaves of control and late-infested (LI) plants. Averages of three samples \pm SE are presented. Mean values with one asterisk are significantly different as determined by a Student's t test (p -value \leq 0.05). DW = dry weight.

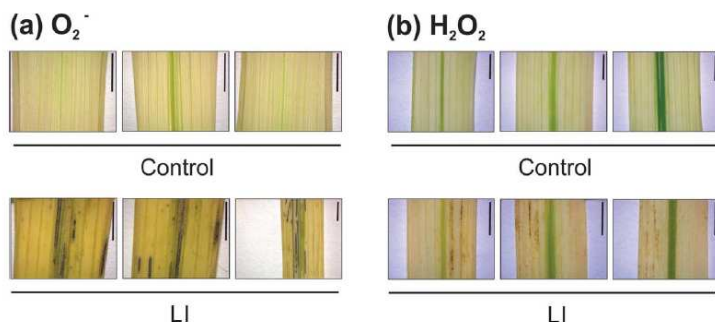


Fig. 3. Histochemical staining assay of O_2^- (a) and H_2O_2 (b) by nitro blue tetrazolium (NBT) and diaminobenzidine (DAB), respectively, in rice leaves of control and late-infested (LI) plants. The positive staining (detected in higher levels on infested leaves) in the photomicrographs shows as bright images (blue-color for NBT and brown-color for DAB). Bars in figures indicate 0.5 cm (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

concentration was reported in cucumber and rose after *Tetranychus urticae* mite infestation (Park and Lee, 2002; Landeros et al., 2004). In addition, the establishment of a senescence process in tomato plants was detected after *T. urticae* infestation (Alba et al., 2015). However, this is the first time that such events are reported after *S. oryzae* infestation in rice plants.

An imbalance between production of ROS and sufficient enzymatic and non-enzymatic protection has been implicated in senescence processes (Afify et al., 2011). To check if the senescence process detected in late-infested leaves is followed by an accumulation of superoxide radical (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), we used NBT and DAB for *in situ* histochemical localization. As seen in Fig. 3a and b, high levels of both ROS can be detected only on LI rice leaves. The accumulation is exactly on the infestation site, and is not spreading over the entire leaf blade. Although bean and *Arabidopsis* plants infested by *T. urticae* also accumulate H_2O_2 in their leaf blades (Farouk and Osman, 2012; Santamaria et al., 2012), this is the first report of ROS accumulation in rice leaves after *S. oryzae* infestation. The high accumulation of ROS on the infestation site can indicate that defense strategies in rice are not effective against *S. oryzae* infestation, since this broad range of oxidative responses may initiate destructive oxidative processes, such as chlorophyll bleaching, lipid peroxidation, protein oxidation, and damage to nucleic acids, ultimately leading to cell death (Farouk and Osman, 2012). As seen in Fig. 4, Evans Blue staining indicated for the first time that *S. oryzae* late-infested rice leaves exhibit high levels of plasma membrane integrity loss, indicating cell death promoted by high levels of mite infestation.

3.2. Overview of the proteomic analysis results

Using MudPIT, a total of 2731 different proteins were identified in

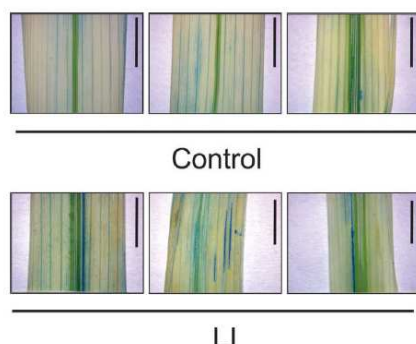


Fig. 4. Loss of plasma membrane integrity in rice leaves of control and late-infested (LI) plants, detected by histochemical staining using Evans Blue reagent. The positive staining (detected in higher levels on infested leaves) in the photomicrographs is shown as bright images (blue-color). Bars in figures indicate 0.5 cm (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

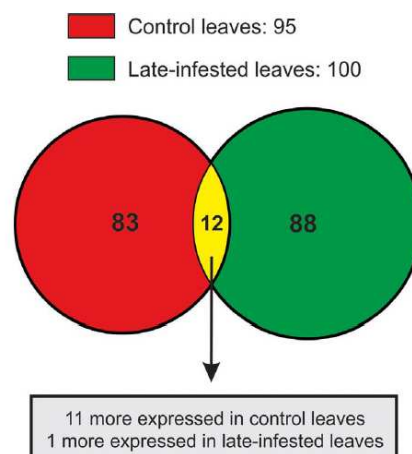


Fig. 5. Overlap of significantly differentially expressed rice proteins identified in the control (non-infested) and late-infested leaves. The data presented in the Venn diagram was produced with PatternLab's AAPV module, using a 0.01 probability threshold. Red circle: unique in control condition; green circle: unique in late-infested condition; yellow intersection: found in both conditions. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

both conditions (Supplementary Table 2). After statistical analysis (PatternLab program), only 183 proteins were considered significantly differentially expressed, being 95 in control leaves and 100 in late-infested (LI) leaves (Fig. 5). Only 12 of these proteins (6.5%) were detected in both conditions (11 were considered significantly over-expressed in control leaves and one in LI), while 83 (45.3%) were uniquely identified in control and 88 (48.1%) in LI samples. The lists of these proteins, unique or significantly differentially expressed, are presented in Tables 1 and 2.

The corresponding sequence of each identified protein was submitted to NCBI blastp in order to identify and annotate the protein. Specific domains and molecular functions were manually checked. Afterwards, proteins were arbitrarily classified in functional categories, according to its putative molecular function. Proteins exclusively found or over-expressed in control leaves include the following major functional categories: translation, carbohydrate metabolism and energy production, protease inhibitors, photosynthesis, stress response, general metabolic processes, oxidative stress, transport, amino acid metabolism, protein modification or degradation, and DNA structure maintenance (Table 1). Proteins exclusively found or over-expressed in late-infested leaves include the following major functional categories: general metabolic processes, protein modification or degradation, carbohydrate metabolism and energy production, translation, amino acid metabolism, oxidative stress, DNA structure maintenance, transport, hormone signaling, lipid metabolism, photosynthesis, and protease

Table 1

List of unique or differentially expressed proteins identified by MudPIT in rice leaves under control condition, in relation to late-infested condition.

Proteins EXCLUSIVELY FOUND or more expressed in Control leaves					
Functional categories	Description	Locus	E-value	Spectral counts Control/ Infested	Fold change
Translation-related	ribosome recycling factor	LOC_Os07g38300	0	131/12	10.92
	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	LOC_Os06g48750	0	123/36	3.42
	<u>tRNA synthetase class II domain containing</u>	LOC_Os02g46130	0	12	–
	60S ribosomal protein L18a	LOC_Os05g49030	1e–132	11	–
	elongation factor	LOC_Os01g52470	0	11	–
	eukaryotic translation initiation factor	LOC_Os07g02210	2e–118	11	–
	eukaryotic translation initiation factor	LOC_Os05g49150	0	8	–
	60S ribosomal protein L15	LOC_Os05g19370	4e–147	7	–
	initiation factor 2 subunit family domain	LOC_Os11g11050	0	5	–
	50S ribosomal protein L15, chloroplast	LOC_Os03g12020	0	3	–
	60S ribosomal protein L27a-3	LOC_Os02g07890	9e–101	3	–
	L1P family of ribosomal proteins domain	LOC_Os02g21660	6e–159	3	–
	40S ribosomal protein S4	LOC_Os01g25610	0	2	–
	elongation factor Tu	LOC_Os02g25870	0	2	–
	DNA directed RNA polymerase, 7 kDa subunit	LOC_Os01g34614	3e–32	2	–
	ribosomal protein L37	LOC_Os02g02130	4e–63	2	–
	tRNA synthetases class II domain containing	LOC_Os07g30200	0	2	–
Carbohydrate metabolism and energy production	<u>phosphoglycerate kinase</u>	LOC_Os06g45710	0	113/13	8.69
	<u>ATP synthase gamma chain</u>	LOC_Os07g32880	0	537/120	4.48
	ATP synthase	LOC_Os06g45120	0	112/50	2.24
	NAD dependent epimerase/dehydratase	LOC_Os07g40974	0	12	–
	NAD dependent epimerase/dehydratase	LOC_Os03g16980	0	11	–
	glycosyl hydrolases family 17	LOC_Os01g71860	0	10	–
	sucrose-phosphatase	LOC_Os02g05030	0	10	–
	FGGY family of carbohydrate kinases	LOC_Os07g44660	0	5	–
	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase	LOC_Os07g32010	0	5	–
Protease inhibitors	electron transfer flavoprotein subunit	LOC_Os04g10400	0	3	–
	LTPL122 – Protease inhibitor/seed storage	LOC_Os04g46830	7e–91	141/6	23.50
	LTPL113 – Protease inhibitor/seed storage	LOC_Os02g44320	4e–86	289/20	14.45
	<u>LTPL11 – Protease inhibitor/seed storage</u>	LOC_Os12g02310	1e–70	29	–
	cysteine proteinase inhibitor precursor	LOC_Os05g41460	2e–75	10	–
	LTPL152 – Protease inhibitor/seed storage	LOC_Os05g47700	1e–59	8	–
	LTPL17 – Protease inhibitor/seed storage	LOC_Os05g40010	6e–83	8	–
	LTPL160 – Protease inhibitor/seed storage	LOC_Os10g36170	7e–58	6	–
	serpin domain containing protein	LOC_Os03g41419	2e–168	2	–
Photosynthesis	pre-protein translocase subunit secA	LOC_Os01g21820	4e–33	7	–
	cytochrome c	LOC_Os05g34770	7e–80	3	–
	divinyl reductase (DVR)	LOC_Os03g22780	0	3	–
	<u>apocytochrome f precursor</u>	LOC_Os08g15280	9e–71	102/4	25.50
	<u>photosystem II 5 kDa protein, chloroplast</u>	LOC_Os02g37060	6e–77	432/135	12.34
	photosystem I iron-sulfur center	LOC_Os10g21406	1e–54	439/37	11.86
	photosystem II D2	LOC_Os10g41689	0	98/26	3.77
Stress response	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	LOC_Os07g09040	9e–123	11	–
	RALFL23 – Rapid Alkalinization Factor	LOC_Os11g26190	2e–71	8	–
	polyprenyl synthetase	LOC_Os01g50760	0	5	–
	stress responsive protein	LOC_Os03g21040	0	5	–
	WD domain, G-beta repeat domain containing	LOC_Os05g47890	0	4	–
	ranBP1	LOC_Os03g18180	4e–148	2	–
General metabolic processes	<u>pyruvate kinase</u>	LOC_Os12g05110	0	38	–
	aldehyde dehydrogenase	LOC_Os02g49720	0	9	–
	dehydrogenase	LOC_Os08g01760	0	8	–
	dehydrogenase	LOC_Os03g01190	0	6	–
	aldehyde dehydrogenase	LOC_Os11g08300	0	2	–
	iron-sulfur cluster assembly enzyme	LOC_Os01g47340	2e–122	2	–
Oxidative stress-related	ferredoxin-thioredoxin reductase	LOC_Os02g42570	2e–104	33	–
	oxidoreductase, aldo/keto reductase	LOC_Os10g02480	0	6	–
	thioredoxin	LOC_Os01g07376	2e–94	6	–
	thioredoxin	LOC_Os05g07690	4e–95	5	–
	thioredoxin	LOC_Os04g53740	2e–93	3	–
Transport-related	transporter-related	LOC_Os02g49260	1e–32	7	–
	mitochondrial import inner membrane	LOC_Os03g61019	4e–57	4	–
	vesicle transport protein GOT1B	LOC_Os07g40320	9e–39	4	–
	mitochondrial import inner membrane	LOC_Os03g19290	5e–126	2	–
Amino acid metabolism	2-isopropylmalate synthase B	LOC_Os11g04670	1e–44	9	–
	fumarylacetoacetase	LOC_Os03g61330	3e–163	5	–
	methionine sulfoxide reductase	LOC_Os03g24600	4e–98	2	–
	heat shock protein	LOC_Os08g39140	9e–118	8	–

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Proteins EXCLUSIVELY FOUND or more expressed in Control leaves					
Functional categories	Description	Locus	E-value	Spectral counts Control/ Infested	Fold change
Protein modification/degradation	OsClp9 – Putative Clp protease homologue	LOC_Os06g04530	0	6	–
	ubiquitin-like protein 5	LOC_Os12g04924	7e–48	5	–
	chaperone protein dnaJ	LOC_Os03g44620	0	2	–
DNA structure maintenance	histone H1	LOC_Os04g18090	1e–119	4	–
	regulator of chromosome condensation	LOC_Os02g34860	0	3	–
Nitrogen metabolism	nitrogen regulatory protein P-II	LOC_Os05g04220	4e–152	4	–
Development-related	homeobox protein knotted-1	LOC_Os02g08544	8e–158	2	–
Signal transduction	ras-related	LOC_Os07g31370	5e–152	2	–
Lipid metabolism	acyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	LOC_Os05g03480	0	2	–
Others	regulator of ribonuclease	LOC_Os02g52450	1e–118	11	–
	plastid developmental protein DAG	LOC_Os04g51280	9e–62	7	–
	thiamine biosynthesis protein thiC	LOC_Os03g47610	1e–88	6	–
	heavy metal-associated domain containing	LOC_Os02g32814	0	4	–
	RNA recognition motif	LOC_Os06g02240	0	4	–
	T-complex protein	LOC_Os06g36700	0	4	–
	HAD-superfamily hydrolase	LOC_Os03g19760	3e–48	3	–
	haloacid dehalogenase-like hydrolase	LOC_Os06g45440	0	3	–
	RNA recognition motif	LOC_Os04g50110	0	3	–
	RNA recognition motif	LOC_Os10g17454	0	2	–
Unknown	expressed protein	LOC_Os07g05290	5e–60	8	–
	expressed protein	LOC_Os02g57030	0	7	–
	expressed protein	LOC_Os01g50450	0	5	–
	B12D	LOC_Os06g13680	1e–47	4	–
	expressed protein	LOC_Os04g54320	2e–113	4	–
	expressed protein	LOC_Os01g52170	0	4	–
	expressed protein	LOC_Os04g35530	7e–153	3	–
	hairpin-induced protein 1 domain containing	LOC_Os02g33550	1e–162	3	–

Obs. 1: “E-value” represents the expected value of the match between the identified sequence and the sequence blastp found an alignment for in the TIGR Rice database; “–” signal means “uniquely found in control condition”; “Spectral counts” represent the sum from three replicates.

Obs. 2: Bold and underlined sequences were confirmed by RT-qPCR.

inhibitors (Table 2). It is well known that biotic and abiotic stress can affect several molecular functions in rice (Narsai et al., 2013). The same result could be noticed in our Gene Ontology (GO) analyses. The GO annotations of all 183 differentially expressed and unique proteins identified are shown in Fig. 6. Metabolic processes, cellular processes and response to stimulus were the most regulated biological processes (Fig. 6a). The molecular functions of catalytic activity and binding were the most regulated (Fig. 6b).

According to KEGG analysis, fifty-two different pathways were associated with proteins identified as up- or down-regulated (data not shown). The following KEGG pathways involved more than three proteins identified in our dataset: biosynthesis of antibiotics (10), glycolysis/gluconeogenesis (7), amino/nucleotide sugar metabolism (6), aminobenzoate degradation (4), pyruvate metabolism (4), aminoacyl-tRNA biosynthesis (4), purine metabolism (4), starch and sucrose metabolism (4), cysteine/methionine metabolism (4), terpenoid backbone biosynthesis (4). Terpenoids have an extensive range of important roles in plants, including plant-pathogen interactions (Fall and Solomon, 2011), and the presence of a large number of terpenoid compounds in rice has been positively correlated with reduced pathogen infection (Peters, 2006). The aminobenzoate degradation pathway, which has functions in xenobiotics biodegradation and metabolism (Li et al., 2016), was represented only by proteins uniquely found in LI leaves. We hypothesize that the well-established senescence process in LI leaves is partially responsible for degradation of cell compounds and generation of metabolic byproducts. In addition, *S. oryzae* infestation probably generates toxic compounds in rice cells that can be treated as xenobiotics. In our analysis, we identified a glutathione S-transferase protein only in LI leaves (Table 2). According to Noctor et al. (2012), these proteins can function in the detoxification of heavy metals and

xenobiotics. We observed that the pyruvate metabolism pathway is down-regulated, while amino/nucleotide sugar and cysteine/methionine metabolism are up-regulated (data not shown). This suggests a severe modification in primary metabolic pathways.

3.3. Differentially expressed proteins in rice leaves infested with *S. oryzae*

Several proteins of essential processes as translation, carbohydrate metabolism/energy production, defense-related protease inhibitors, photosynthesis, and stress response were found as unique or more abundant in control leaves compared to LI. It indicates that high infestation of *S. oryzae* can cause serious and irreversible damage in rice leaves, since all these processes are seriously affected and less active in LI leaves, according to protein abundance (Table 1). In general, *S. oryzae* high infestation stress induces profound alterations in protein network including those participating in general metabolic processes and protein modification/degradation (Table 2).

The “translation-related” functional category presented the highest number of differentially expressed proteins (17), with higher expression in control leaves than LI leaves (Table 1). Interestingly, Buffon et al. (2016) showed that rice leaves infested by a small population of *S. oryzae* increases the expression of translation-related proteins and, consequently, increase protein level. Therefore, it seems that the progress of infestation and its intensity leads to a negative effect on protein synthesis in rice leaves. According to Narsai et al. (2013), this is a common response of rice cultivars susceptible to bacterial and fungal infection, while resistant cultivars display up-regulation of translation during parasite infection. Another plausible explanation for such a decrease in expression of translation-related proteins in LI leaves is that translation is finely repressed under stress conditions to prevent

Table 2

List of unique or differentially expressed proteins identified by MudPIT in rice leaves under late-infested condition, in relation to control condition.

Proteins EXCLUSIVELY FOUND or more expressed in LATE-INFESTED leaves					
Functional categories	Description	Locus	E-value	Spectral counts Control/ Infested	Fold change
General metabolic processes	NADH dehydrogenase 1 alpha sub-complex	LOC_Os02g57180	0	5	–
	inositol-1-monophosphatase	LOC_Os07g09330	0	5	–
	amine oxidase, flavin-containing domain	LOC_Os03g08570	0	4	–
	polyprenyl synthetase	LOC_Os12g17320	0	4	–
	cysteine-rich repeat secretory protein	LOC_Os05g02200	0	3	–
	hydrolase	LOC_Os01g37960	0	3	–
	methyltransferase domain containing	LOC_Os01g51530	0	3	–
	dehydrogenase, putative, expressed	LOC_Os09g32640	0	2	–
	kinase	LOC_Os06g12590	0	2	–
	nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	LOC_Os01g58640	0	2	–
	thiamine pyrophosphate enzyme, C-terminal	LOC_Os01g32080	0	2	–
	methylthioribose kinase	LOC_Os04g57400	0	2	–
	methyltransferase domain containing	LOC_Os06g43800	0	2	–
Protein modification or degradation	oryzain gamma chain precursor	LOC_Os09g27030	0	7/64	–9.14
	aspartic proteinase oryzasin-1 precursor	LOC_Os05g49200	0	6	–
	ubiquitin-conjugating enzyme	LOC_Os01g46926	6e–108	4	–
	Ser/Thr protein phosphatase	LOC_Os01g49690	0	3	–
	ubiquitin family	LOC_Os07g31540	0	3	–
	OsDegp15 – Putative Deg protease homologue	LOC_Os12g42210	1e–109	3	–
	OsSub30 – Putative Subtilisin homologue	LOC_Os03g40830	0	2	–
	OsSub53 – Putative Subtilisin homologue	LOC_Os07g39020	0	2	–
	Ser/Thr protein phosphatase	LOC_Os06g43640	0	2	–
	Ser/Thr protein phosphatase	LOC_Os12g44020	0	2	–
Carbohydrate metabolism and energy production	ubiquitin family domain containing protein	LOC_Os01g68940	3e–70	2	–
	ATP synthase protein 9, mitochondrial	LOC_Os12g34108	4e–28	93	–
	NAD dependent epimerase/dehydratase	LOC_Os02g35039	0	17	–
	amidase	LOC_Os04g02754	0	14	–
	maltose excess protein 1-like, chloroplast	LOC_Os04g51330	0	6	–
	aldose 1-epimerase	LOC_Os04g38530	0	4	–
	mannose-1-phosphate guanyl transferase	LOC_Os01g62840	0	4	–
	lactate/malate dehydrogenase	LOC_Os02g01510	0	3	–
	glycosyl hydrolase	LOC_Os01g47070	0	2	–
	glycosyl hydrolases family 17	LOC_Os01g71380	0	2	–
Translation-related	methionyl-tRNA synthetase	LOC_Os03g11120	0	7	–
	threonyl-tRNA synthetase, mitochondrial	LOC_Os08g19850	0	3	–
	polyadenylate-binding protein	LOC_Os08g22354	0	3	–
	ribosomal protein	LOC_Os03g55930	3e–162	2	–
	40S ribosomal protein S26	LOC_Os01g60790	6e–92	2	–
	60S ribosomal protein L8	LOC_Os12g38000	2e–24	2	–
Amino acid metabolism	40S ribosomal protein S28	LOC_Os10g27174	5e–39	2	–
	cysteine desulfurase 1, mitochondrial	LOC_Os09g16910	0	8	–
	3-isopropylmalate dehydratase	LOC_Os02g03260	0	6	–
	argininosuccinate lyase	LOC_Os03g19280	0	5	–
	OsSCP3 – Putative Serine Carboxypeptidase	LOC_Os01g22980	0	3	–
Oxidative stress-related	aspartate aminotransferase	LOC_Os09g28050	0	3	–
	glutathione S-transferase	LOC_Os10g38780	2e–168	7	–
	peroxidase	LOC_Os07g02440	0	3	–
	glutathione peroxidase	LOC_Os11g18170	4e–88	2	–
	peroxidase	LOC_Os08g02110	0	2	–
DNA structure maintenance	<u>core histone H2A/H2B/H3/H4</u>	LOC_Os05g02300	1e–104	49	–
	<u>histone H3</u>	LOC_Os06g04030	1e–94	18	–
	Core histone H2A/H2B/H3/H4	LOC_Os10g28230	4e–94	6	–
	HMG1/2	LOC_Os04g47690	3e–87	4	–
Transport-related	importin subunit beta	LOC_Os12g38110	0	10	–
	TOC159	LOC_Os05g05950	0	3	–
	mitochondrial import inner membrane	LOC_Os05g02060	8e–105	3	–
	adaptin protein	LOC_Os03g23950	0	3	–
Hormone signaling	gibberellin receptor GID1L2	LOC_Os07g06830	0	5	–
	tetratricopeptide repeat containing	LOC_Os05g31770	1e–117	3	–
Lipid metabolism	3-deoxy-manno-octulosonate	LOC_Os05g48750	0	12	–
	cytidyltransferase				
	acyl CoA binding protein	LOC_Os08g06550	3e–61	8	–
Photosynthesis	chloroplast post-illumination chlorophyll	LOC_Os03g38950	0	4	–
	PAP fibrillin family domain containing	LOC_Os07g28790	0	2	–

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Proteins EXCLUSIVELY FOUND or more expressed in LATE-INFESTED leaves					
Functional categories	Description	Locus	E-value	Spectral counts Control/ Infested	Fold change
Protease inhibitors	LTPL129 – Protease inhibitor/seed storage	LOC_Os06g43600	1e-166	15	–
	LTPL114 – Protease inhibitor/seed storage	LOC_Os03g01300	1e-89	5	–
Transferase	phosphoribosyl transferase	LOC_Os02g40010	4e-151	5	–
Nucleotide metabolism	adenylosuccinate synthetase, chloroplast	LOC_Os03g49220	0	4	–
Secondary metabolism	lycopene beta cyclase, chloroplast precursor	LOC_Os02g09750	0	4	–
Cell wall-related	alpha-N-arabinofuranosidase A	LOC_Os03g20420	0	3	–
Stress response	hevamine-a-like	LOC_Os01g64110	0	7	–
	CHIT1 – Chitinase family protein precursor	LOC_Os02g39330	0	2	–
Stress-response/allergens	pathogenesis-related Bet v I family	LOC_Os12g36850	3e-113	2	–
Others	ki1	LOC_Os09g36520	0	5	–
	HEAT repeat family protein	LOC_Os02g07120	0	3	–
	bifunctional protein fold	LOC_Os02g02850	0	3	–
	pantothenate kinase 4	LOC_Os06g21980	0	2	–
	methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta	LOC_Os08g32850	0	2	–
	haloacid dehalogenase-like hydrolase	LOC_Os09g24230	3e-136	2	–
	actin-depolymerizing factor	LOC_Os03g60580	5e-107	2	–
	expressed protein	LOC_Os07g29240	0	12	–
	expressed protein	LOC_Os11g21990	0	12	–
Unknown	expressed protein	LOC_Os10g39150	2e-120	9	–
	expressed protein	LOC_Os01g66980	2e-166	7	–
	expressed protein	LOC_Os02g30410	8e-135	4	–
	expressed protein	LOC_Os01g26039	0	3	–
	expressed protein	LOC_Os03g03470	0	3	–
	expressed protein	LOC_Os10g22460	0	3	–
	expressed protein	LOC_Os12g06335	0	3	–
	uncharacterized conserved membrane protein	LOC_Os05g33290	4e-58	2	–

Obs. 1: "E-value" represents the expected value of the match between the identified sequence and the sequence blastp found an alignment for in the TIGR Rice database; "-" signal means "uniquely found in late-infested condition"; "Spectral counts" represent the sum from three replicates.

Obs. 2: Bold and underlined sequences were confirmed by RT-qPCR.

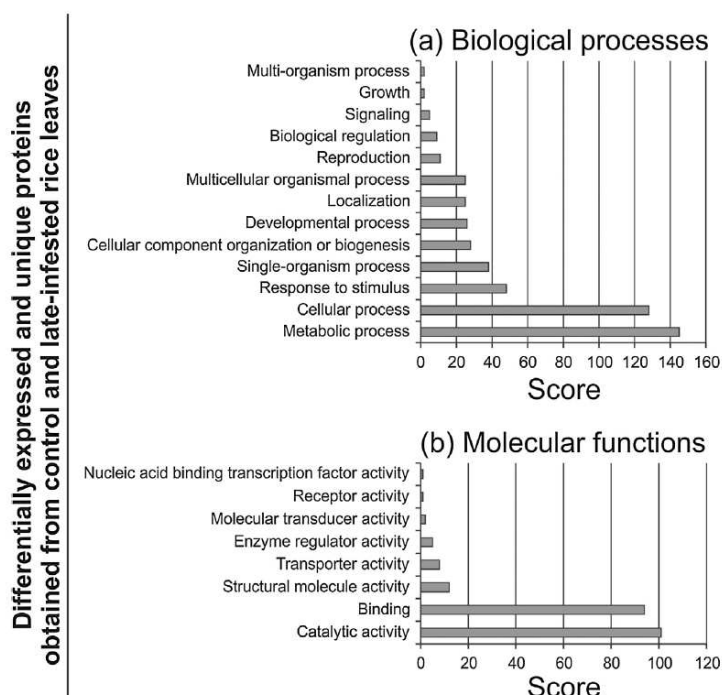


Fig. 6. Gene Ontology annotation. Biological processes (a) and Molecular functions (b) for differentially expressed and unique proteins obtained from control and late-infested rice leaves.

production of peptides from aberrant transcripts (Cooper et al., 2003). Anyway, it would be interesting to test if the maintenance of translation-related proteins expression could effectively avoid the increase of *S. oryzae* population number in rice leaves.

Even though the functional category “carbohydrate metabolism/energy production” was found up- and down-regulated by *S. oryzae* late infestation in rice leaves (Tables 1 and 2), we believe that infested leaves present a markedly reduction in energy production. This hypothesis is reinforced by 1) two ATP synthases more abundant in control than in LI leaves; 2) KEGG analysis showed that pyruvate metabolism pathway is down-regulated in LI leaves; 3) seven proteins related to photosynthesis are also down-regulated in LI leaves, which probably impact NADPH production and, consequently, glucose and ATP synthesis; and 4) decrease in carbon assimilation and energy production was also detected in rice under brown planthopper infestation (Sangha et al., 2013). Previously, we also found down-regulation of photosynthesis- and carbohydrate metabolism/energy production-related proteins in rice leaves early infested by *S. oryzae* (Buffon et al., 2016); however, the identities of the proteins are mostly different in early and LI leaves. It is interesting to highlight that the reduction in the expression of proteins related to photosynthesis was more apparent in early responses to *S. oryzae* infestation (Buffon et al., 2016), even though we were only able to detect a reduction in chlorophyll concentration and the establishment of a senescence process in highly infested leaves (Fig. 2).

According to our results, even under intense infestation by *S. oryzae*, proteins commonly used in plant defense strategy to prevent herbivory attack were down regulated. Several protease inhibitors were found more abundant or uniquely identified in control leaves (Table 1). Plant protease inhibitors are important natural plant defenses targeting herbivorous proteases (War et al., 2012). Down-regulation of protease inhibitors indicates that the defense mechanism based on inhibition of mite proteases was not effective and shut down, contributing to the fast increase in mite population. Strategies to exploit plant protease inhibitors to protect crops against herbivorous are not novel. Several bioassays show that pests exposed to protease inhibitors have a slower growth rate, retarded development, and increased mortality (Mosolov and Valueva, 2008; Gatehouse, 2011). It would be interesting to test if the increased expression of protease inhibitors could protect rice plants against *S. oryzae* infestation, as previously suggested by Gatehouse (2011) and Kunert et al. (2015).

Several proteins related to protein modification/degradation were found up-regulated in LI leaves (Table 2). It is known that senescence process is accompanied by an increase in protein degradation level, and such a process can be stimulated by biotic stress (Diaz-Mendoza et al., 2016). LI leaves showed an early senescence process (Fig. 2), it is therefore not surprising that several proteins related to proteolysis are highly expressed in these leaves. We detected three proteins related to ubiquitination process expressed only in LI leaves (Table 2). Ubiquitination process is important in protein degradation/signaling and regulation of several mechanisms related to stress responses (Dametto et al., 2015), including defense against biotic threats (Dreher and Callis, 2007). According to Jeon et al. (2012), ectopic expression of ubiquitin-conjugating enzyme gene from wild rice *Oryza grandiglumis* (*OgUBC1*) confers resistance against *Botrytis infection* in Arabidopsis. We also detected proteins related to protein modification only in LI leaves (Table 2), including proteases and phosphatases. Wang et al. (2015) showed that aspartic proteases might be associated with virus-induced cell death in rice leaves, and in certain plant-pathogen interactions, the cell death seems to be mediated by specific proteases (Fagundes et al., 2015). Interestingly, in our study LI leaves presented higher levels of cell death than the control leaves (Fig. 4). Ser/Thr-phosphatases normally act as negative regulators of plant defense responses against pathogens, suggesting the existence of active signaling pathways in the absence of stress that require continuous Ser/Thr phosphatase activity to remain inhibited (País et al., 2009a). In agreement with our results,

transcripts of the catalytic subunits of Ser/Thr phosphatase PP2A subfamily I are up-regulated by fungal elicitors in potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) (País et al., 2009b). As activation of defense-related protein phosphorylation cascades leads to oxidative burst and localized cell death (as seen in Figs. 3 and 4), the up-regulation of potential negative modulators by pathogens may be a protective mechanism in order to prevent extensive damage to host tissues (País et al., 2009a).

Six proteins belonging to the “stress response” functional category were found only in control leaves, while two proteins associated with this same category were uniquely identified in LI leaves (Tables 1 and 2). Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase was recently described as responsive to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* infection in wheat plants, regulating the immune response (Yang et al., 2016). Rapid Alkalinization Factors (RAF's) are small peptides affecting acidification and cell expansion during growth and development (Murphy and De Smet, 2014). The absence of these proteins in LI leaves suggests that *S. oryzae* causes a deregulation of the immune response (resulting in a mite-susceptible phenotype) and a restriction in cell expansion. It would be interesting to test if both proteins expressed in rice leaves during the entire development period could enhance rice resistance to *S. oryzae*. On the other hand, the presence of both hevine- α -like and chitinase solely in LI leaves suggest that these leaves are still trying to combat *S. oryzae* infestation, as previously reported by Maserti et al. (2011) in citrus leaves infested by *Tetranychus urticae*.

The “oxidative stress-related” functional category comprehend five proteins exclusively identified in control leaves (Table 1) and four proteins expressed only in LI leaves (Table 2). Chloroplast thioredoxins are reduced by ferredoxin-thioredoxin reductases (Serrato et al., 2004) that are required for proper chloroplast development and is involved in the regulation of plastid gene expression in Arabidopsis (Wang et al., 2014). According to Lim et al. (2010), silencing a ferredoxin-thioredoxin reductase induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tomato plants. Since we found a down regulation of this same protein in our results, it could be an evolutionary conserved and complementary defense strategy used by rice leaves infested with *S. oryzae*. On the other hand, three peroxidases expressed only in LI leaves suggest a hazardous H₂O₂ accumulation in these leaves, as confirmed by histochemical analysis (Fig. 3b). Also, the presence of one glutathione S-transferase (the same expressed in early-infested leaves – Buffon et al., 2016) only in LI leaves suggest a long exposure of the host tissues to oxidative burst caused by herbivorous attack (Ferry et al., 2011).

For several functional categories, we were not able to detect a consistent response to *S. oryzae* late-infestation, solely based on the differentially expressed proteins. Even though, we can certainly claim that high levels of *S. oryzae* mites on rice leaves affect intracellular transport, amino acid metabolism, DNA structure maintenance, and lipid metabolism (Tables 1 and 2). More studies are needed to elucidate if these proteins can be used in biotechnological approaches to generate rice plants more resistant to *S. oryzae* infestation.

3.4. Validation of proteomic data

To validate the proteomic analysis, we performed enzymatic assays and RT-qPCR analysis. The enzymatic assay results reflected those of our proteomic analysis, except for lactate dehydrogenase. The enzymatic activities presented in Fig. 7 corresponding to glutathione S-transferase, phosphatase, aspartate aminotransferase, protease, and peroxidase (Fig. 7a, b, d, e, f), all included proteins that were only detected in LI rice leaves in proteomic results and consequently resulted in higher levels of activity. Lactate dehydrogenase activity (Fig. 7c) was found to be higher in control than in LI leaves, which is not reflected in our proteomic analysis, evidencing some kind of post-translational control mechanism. The identification and validation of known enzymes in the context of the interaction of pathogen/parasite with its

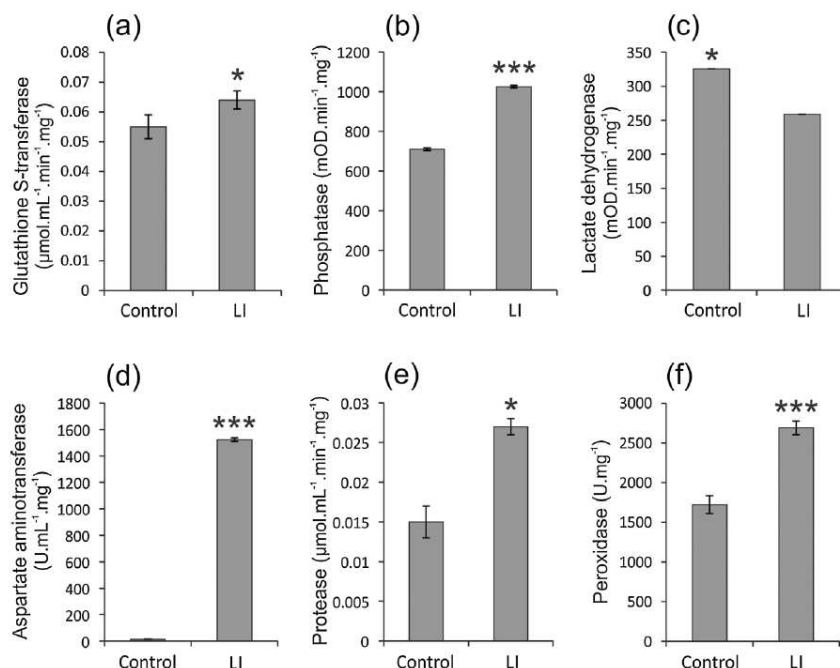


Fig. 7. Validation of proteomic results using enzymatic assays. Enzymatic activities of Glutathione S-transferase (a), Phosphatase (b), Lactate dehydrogenase (c), Aspartate aminotransferase (d), Protease (e), and Peroxidase (f) in rice leaves of control and late-infested (LI) plants. Represented values are the averages of three samples \pm SE. Mean values with one, two or three asterisks are different by Student's *t* test (*p*-value \leq 0.05, 0.01, and 0.001, respectively).

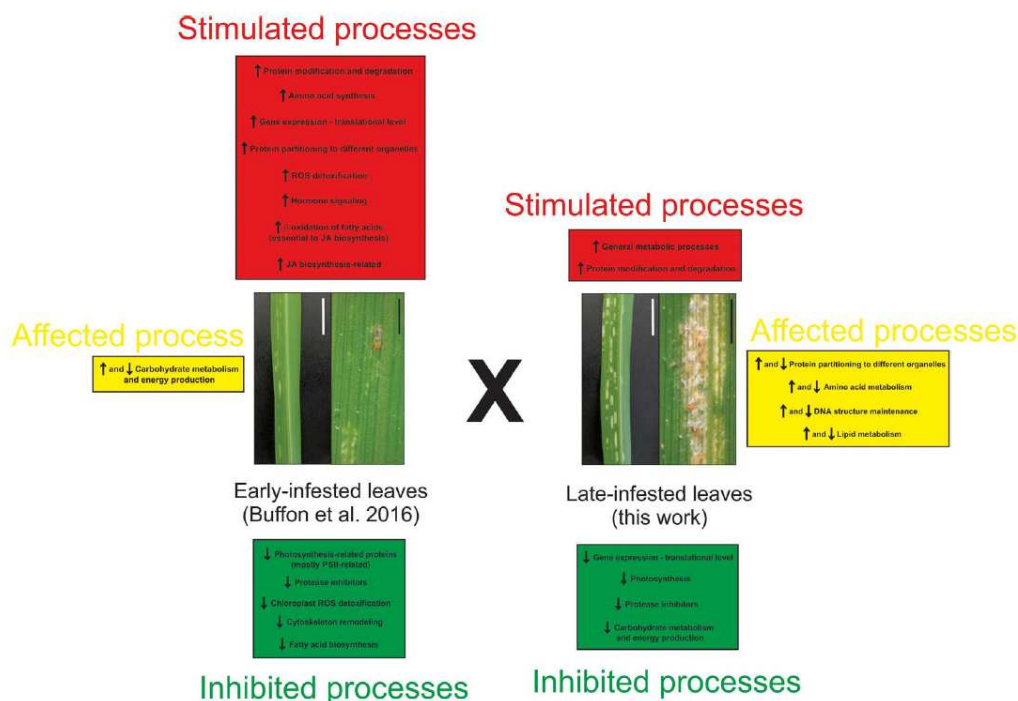


Fig. 8. Schematic model of the rice processes stimulated (red color), inhibited (green color), and affected (yellow color) by *S. oryzae* early (Buffon et al., 2016) and late infestation (this work), based on the proteomic and physiological results presented in both studies. JA: jasmonic acid; PS: photosystem II; ROS: reactive oxygen species. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

specific host supports the use of the experimental design presented here.

The mRNA expression of nine genes (all listed in Supplementary Table 1) corresponding to proteins identified as differentially expressed

during *S. oryzae* infestation was further evaluated in control and LI leaves by quantitative RT-PCR (Supplementary Fig. 1). The differences in expression highlighted by the MudPIT methodology were confirmed for the nine tested genes, even though the fold change detected at the

mRNA (Supplementary Fig. 1) and protein levels (Tables 1 and 2) were different. This was probably due to a regulation at the post-transcriptional level. In a wider view, the correlation of the proteomic data with mRNA expression, and also enzymatic activity, reinforces the involvement of these specific proteins in rice responses to mite LI.

4. Conclusions

This is the first report evaluating the rice response to phytophagous mite *S. oryzae* late infestation using a high-throughput proteomic approach. The schematic model in Fig. 8 shows how specific these findings are in relation to that found in “early-infested” rice leaves (Buffon et al., 2016). The main molecular processes repressed in rice leaves by *S. oryzae* late infestation are photosynthesis, translation, carbohydrate metabolism/energy production, and production of protease inhibitors. On the other hand, high infestation levels induce protein modification/degradation pathways. Altogether, these processes and the identification of differentially expressed proteins are helpful to reveal the molecular mechanisms involved in the response of rice to high levels of mite infestation, and yield a set of interesting potential targets for future studies aiming to promote phytophagous mite resistance in rice plants, or, at least, to prevent the mite population increase.

Acknowledgements

This research was supported by grants from University of Taquari Valley – UNIVATES and from the National Institute of General Medical Sciences (8 P41 GM103533). MLA is supported by startup funds from the University of Ottawa. The authors thank Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) for technical support and Jonas Bernardes Bica for technical support in the use of stereomicroscope.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2017.10.005>.

References

- Affify, A.E.M.M.R., El-Beltagi, H.S., Fayed, S.A., Shalaby, E.A., 2011. Acaricidal activity of different extracts from *Syzgium cumini* L. Skeels (Pomposia) against *Tetranychus urticae* Koch. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 1, 359–364.
- Agut, B., Gamir, J., Jaques, J.A., Flors, V., 2015. *Tetranychus urticae*-triggered responses promote genotype dependent conspecific repellence or attractiveness in citrus. *New Phytol.* 207, 790–804.
- Ahmadi, N., Audebert, A., Bennett, M.J., Bishopp, A., de Oliveira, A.C., et al., 2014. The roots of future rice harvests. *Rice* 7, 29.
- Alba, J.M., Glas, J.J., Schimmel, B.C.J., Kant, M.R., 2011. Avoidance and suppression of plant defenses by herbivores and pathogens. *J. Plant Interact.* 6, 1–7.
- Alba, J.M., Schimmel, B.C.J., Glas, J.J., Ataide, L.M.S., Pappas, M.L., et al., 2015. Spider mites suppress tomato defenses downstream of jasmonate and salicylate independently of hormonal cross-talk. *New Phytol.* 205, 828–840.
- Blasi, E.A.R., Buffon, G., da Silva, R.Z., Stein, C., Dametto, A., et al., 2015. Alterations in rice, corn and wheat plants infested by phytophagous mite. *Int. J. Acarol.* 41, 10–18.
- Buffon, G., Blasi, E.A.R., Adamski, J.M., Ferla, N.J., Berger, M., et al., 2016. Physiological and molecular alterations promoted by *Schizotetranychus oryzae* mite infestation in rice leaves. *J. Proteome Res.* 15, 431–446.
- Carvalho, P.C., Fischer, J.S., Xu, T., Yates, J.R., Barbosa, V.C., 2012. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. *Curr. Protoc. Bioinf.* 13, 13–19.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., et al., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674–3676.
- Cooper, B., Clarke, J.D., Budworth, P., Kreps, J., Hutchison, D., et al., 2003. A network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4945–4950.
- Dametto, A., Buffon, G., Blasi, E.A.R., Sperotto, R.A., 2015. Ubiquitination pathway as a target to develop abiotic stress tolerance in rice. *Plant Signal. Behav.* 10, e1057369.
- de Oliveira, E.F., Pallini, A., Janssen, A., 2016. Herbivores with similar feeding modes interact through the induction of different plant responses. *Oecologia* 180, 1–10.
- Díaz-Mendoza, M., Velasco-Arroyo, B., Santamaria, M.E., González-Melendi, P., Martínez, M., et al., 2016. Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genet. Mol. Biol.* 39, 329–338.
- Dreher, K., Callis, J., 2007. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann. Bot.* 99, 787–822.
- Evaristo, A.B., Venzon, M., Matos, F.S., de Freitas, R.G., Kuki, K.N., et al., 2013. Susceptibility and physiological responses of *Jatropha curcas* accessions to broad mite infestation. *Exp. Appl. Acarol.* 60, 485–496.
- Fagundes, D., Bohn, B., Cabreira, C., Leipelt, F., Dias, N., et al., 2015. Caspases in plants: metacaspase gene family in plant stress responses. *Funct. Integr. Genomics* 15, 639–649.
- Fall, L.A.D., Solomon, P.S., 2011. Role of cereal secondary metabolites involved in mediating the outcome of plant-pathogen interactions. *Metabolites* 1, 64–78.
- Farouk, S., Osman, M.A., 2012. Alleviation of oxidative stress induced by spider mite invasion through application of elicitors in bean plants. *Egypt. J. Biol.* 14, 1–13.
- Ferla, N.J., Rocha, M.S., Freitas, T.F.S., 2013. Fluctuation of mite fauna associated to rice culture (*Oryza sativa* L.: poales, Poaceae) in two regions in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *J. Agric. Sci. Technol.* 3, 525–533.
- Ferry, N., Stavroulakis, S., Guan, W., Davison, G.M., Bell, H.A., et al., 2011. Molecular interactions between wheat and cereal aphid (*Sitobion avenae*): analysis of changes to the wheat proteome. *Proteomics* 11, 1985–2002.
- Gatehouse, J.A., 2011. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 12, 409–416.
- Hummel, N.A., Castro, B.A., McDonald, E.M., Pellerano, M.A., Ochoa, R., 2009. The panicle rice mite, *Stenotarsonemus spinki* Smiley, a rediscovered pest of rice in the United States. *Crop Prot.* 28, 547–560.
- Jaimez-Ruiz, I.A., Otero-Colina, G., Valdovinos-Ponce, G., Villanueva-Jiménez, J.A., Vera-Graziano, J., 2015. Population growth and characterization of plant injuries of *Stenotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae) on rice. *Neotrop. Entomol.* 44, 294–300.
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K., Khurana, J.P., 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 646–651.
- Jeon, E.H., Pak, J.H., Kim, M.J., Kim, H.J., Shin, S.H., et al., 2012. Ectopic expression of ubiquitin-conjugating enzyme gene from wild rice, *OgUBC1*, confers resistance against UV-B radiation and Botrytis infection in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427, 309–314.
- Kant, M.R., Ament, K., Sabelis, M.W., Haring, M.A., Schuurink, R.C., 2004. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiol.* 135, 483–495.
- Kim, S.T., Kim, S.G., Agrawal, G.K., Kikuchi, S., Rakwal, R., 2014. Rice proteomics: a model system for crop improvement and food security. *Proteomics* 14, 593–610.
- Krishnan, H.B., Natarajan, S.S., 2009. A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. *Phytochemistry* 70, 1958–1964.
- Kunert, K.J., van Wyk, S.G., Cullis, C.A., Vorster, B.J., Foyer, C.H., 2015. Potential use of phytochemicals in crop improvement, with a particular focus on legumes. *J. Exp. Bot.* 66, 3559–3570.
- Landeros, J., Guevara, L.P., Badii, M.H., Flores, A.E., Pámanes, A., 2004. Effect of different densities of the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* on CO₂ assimilation, transpiration, and stomatal behaviour in rose leaves. *Exp. Appl. Acarol.* 32, 187–198.
- Li, S.W., Shi, R.F., Leng, Y., Zhou, Y., 2016. Transcriptomic analysis reveals the gene expression profile that specifically responds to IBA during adventitious rooting in mung bean seedlings. *BMC Genomics* 17, 43.
- Lim, C.J., Kim, W.B., Lee, B.S., Lee, H.Y., Kwon, T.H., et al., 2010. Silencing of SIFTR-c, the catalytic subunit of ferredoxin:thioredoxin reductase, induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tomato plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 750–754.
- Lim, S.D., Cho, H.Y., Park, Y.C., Ham, D.J., Lee, J.K., et al., 2013. The rice RING finger E3 ligase, OsHCH1, drives nuclear export of multiple substrate proteins and its heterologous overexpression enhances acquired thermotolerance. *J. Exp. Bot.* 60, 2899–2914.
- Maserti, B.E., Carratore, R.D., Croce, C.M.D., Podda, A., Migheli, Q., et al., 2011. Comparative analysis of proteome changes induced by the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* and methyl jasmonate in citrus leaves. *J. Plant Physiol.* 168, 392–402.
- Mosolov, V.V., Valueva, T.A., 2008. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 44, 233–240.
- Murphy, E., De Smet, I., 2014. Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends Plant Sci.* 19, 664–671.
- Muthayya, S., Sugimoto, J.D., Montgomery, S., Maberly, G.F., 2014. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1324, 7–14.
- Narsai, R., Wang, C., Chen, J., Wu, J., Shou, H., et al., 2013. Antagonistic, overlapping and distinct responses to biotic stress in rice (*Oryza sativa*) and interactions with abiotic stress. *BMC Genomics* 14, 93.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., et al., 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 35, 454–484.
- Oerke, E.C., 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31–43.
- País, S.M., Téllez-Inón, M.T., Capiati, D.A., 2009a. Serine/threonine protein phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. *Plant Signal. Behav.* 4, 1013–1015.
- País, S.M., González, M.A., Téllez-Inón, M.T., Capiati, D.A., 2009b. Characterization of potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) protein phosphatases type 2A catalytic subunits and their involvement in stress responses. *Planta* 230, 13–25.
- Park, Y.L., Lee, J.H., 2002. Leaf cell and tissue damage of cucumber caused by Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 95, 952–957.
- Park, S.Y., Yu, J.W., Park, J.S., Li, J., Yoo, S.C., et al., 2007. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell* 19, 1649–1664.
- Peters, R.J., 2006. Uncovering the complex metabolic network underlying diterpenoid

- phytoalexin biosynthesis in rice and other cereal crop plants. *Phytochemistry* 67, 2307–2317.
- Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A., et al., 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves. *Plant Cell Environ.* 27, 1122–1134.
- Ross, C.W., 1974. *Plant Physiology Laboratory Manual*. Wadsworth Publishing Company, Inc., Belmont, CA, USA.
- Sangha, J.S., Chen, Y.H., Kaur, J., Khan, W., Abduljaleel, Z., et al., 2013. Proteome analysis of rice (*Oryza sativa* L.) mutants reveals differentially induced proteins during Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*) infestation. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 3921–3945.
- Santamaria, M.E., Cambra, I., Martinez, M., Pozancos, C., González-Melendi, P., et al., 2012. Gene pyramiding of peptidase inhibitors enhances plant resistance to the Spider Mite *Tetranychus urticae*. *PLoS One* 7, e43011.
- Serrato, A.J., Pérez-Ruiz, J.M., Spínola, M.C., Cejudo, F.J., 2004. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279, 43821–43827.
- Shi, J., Fu, X.Z., Peng, T., Huang, X.S., Fan, Q.J., et al., 2010. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiol.* 30, 914–922.
- Wang, P., Liu, J., Liu, B., Da, Q., Feng, D., et al., 2014. Ferredoxin:thioredoxin reductase is required for proper chloroplast development and is involved in the regulation of plastid gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 7, 1586–1590.
- Wang, B., Hajano, J.U.D., Ren, Y., Lu, C., Wang, X., 2015. iTRAQ-based quantitative proteomics analysis of rice leaves infected by Rice stripe virus reveals several proteins involved in symptom formation. *Virol. J.* 12, 99.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., et al., 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7, 1306–1320.
- Wu, J.Q., Baldwin, I.T., 2009. Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant Cell Environ.* 32, 1161–1174.
- Yang, Y., Yu, Y., Bi, C., Kang, Z., 2016. Quantitative proteomics reveals the defense response of wheat against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Sci. Rep.* 6, 34261.
- Yoshida, S., 2003. Molecular regulation of leaf senescence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 79–84.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo é o segundo artigo gerado a partir de um trabalho que iniciou no ano de 2012. O primeiro, de Buffon et al. (2016), avaliou plantas de arroz com infestação inicial (EI, *Early Infestation*) ou levemente infestadas com *Schizotetranychus oryzae*, as quais apresentavam cerca de 20 ácaros por folha. Neste segundo artigo avaliamos plantas com infestação tardia (LI, *Late Infestation*) ou altamente infestadas com *S. oryzae*, as quais continham aproximadamente 180 ácaros por folha (as denominações utilizadas para as plantas infestadas se referem exclusivamente ao nível de infestação de ácaros, não tendo nenhuma relação com a idade das mesmas). Mesmo que os dados já tenham sido bastante discutidos no artigo, ainda cabem aqui algumas observações.

Em um primeiro momento, o que pode chamar a atenção ao comparar os dois trabalhos é a diferença na quantidade de proteínas encontradas, mesmo quando comparadas as duas condições controle. Entretanto, isso não foi surpresa, visto que as plantas com alta infestação já se encontravam em processo de senescência, que, conforme Pegadaraju et al. (2005), é caracterizado basicamente por três parâmetros: redução nos níveis de clorofila total, maior expressão do gene *OsSGR* e níveis mais elevados de perda de integridade de membrana plasmática, o que também constatamos neste estudo. Além disso, como já se sabe, durante este estágio a planta passa a degradar uma série de moléculas presentes nas células foliares, aumentando a remobilização de nutrientes das folhas para outros locais da planta (TAN et al., 2017).

Outra situação interessante é que nas folhas LI encontramos somente uma proteína mais expressa em relação à condição controle. Essa proteína, *Oryzain gamma chain precursor*, é da classe das cisteínas proteinases (CPs) (WATANABE et al., 1991), que são as enzimas mais abundantes associadas à senescência foliar em muitas espécies, por estarem envolvidas com uma ampla gama de funções proteolíticas (TAN et al., 2017).

Quanto às estratégias de defesa utilizadas pelas plantas, ainda podemos enfatizar alguns pontos. Os inibidores de protease, por exemplo, são muito importantes na interação planta-herbívoro, uma vez que neutralizam as enzimas digestivas presentes no aparelho bucal dos fitófagos, as quais são usadas por estes para quebrar proteínas, lipídios e carboidratos complexos das plantas e assim obter

a nutrição necessária para seu crescimento e desenvolvimento (LI-BYARLAY et al., 2016). Porém, quando estes inibidores não são eficazes por algum motivo, as plantas precisam utilizar outras maneiras para se defender. Assim, as respostas iniciais são reguladas por fitohormônios, enquanto que as tardias envolvem tipicamente a síntese de fitoalexinas e metabólitos de defesa secundários (AGUT et al., 2015), conforme já mencionado anteriormente. Isso pode ser confirmado com clareza quando fazemos a seguinte comparação:

1) no trabalho de Buffon et al. (2016), os inibidores de proteases foram expressos somente nas plantas em condição controle. Em contrapartida, a via do ácido graxo α linolênico foi representada por proteínas exclusivamente expressas nas folhas com infestação inicial. Este ácido graxo é liberado a partir de lipídeos da membrana plasmática e depois convertido em ácido jasmônico, o que vai provocar a ativação da transcrição de genes relacionados com defesa; 2) no nosso trabalho com a alta infestação, notamos que a categoria funcional de metabolismo secundário somente foi identificada nas amostras de plantas de arroz altamente infestadas. A proteína presente nesta categoria está envolvida na biossíntese de carotenoides (da classe dos terpenos), que possuem, dentre outras funções na célula, o papel de antioxidantes (ARAÚJO; FONSECA; BOITEUX, 2007).

Conforme Mao et al. (2017), com o envelhecimento da planta, a produção de ácido jasmônico diminui bastante, sendo substituído pela produção de compostos secundários. Em *Arabidopsis*, por exemplo, ocorre a produção de glicosinolatos (GLS's) que pertencem à classe dos compostos nitrogenados. Além disso, a categoria funcional “relacionada com parede celular” foi identificada apenas nas folhas LI. As arabinofuranosidases (ARAF's) são proteínas que estão envolvidas com sacarificação e acúmulo de celulose, que gera espessamento de parede celular (SUMIYOSHI et al., 2013), uma defesa física de rigidez de tecido que ajuda as plantas a se protegerem dos danos causados por fitófagos (VET, 1999).

Combater o estresse oxidativo também é uma defesa que as plantas utilizam. Vimos que com a alta infestação, a via do metabolismo de cisteína estava mais expressa. Isso pode ser devido ao fato de a cisteína ser precursora da glutatona, que tem função antioxidante, além de atuar na sinalização redox e na resposta da planta ao estresse, especialmente na produção de camalexina e glicosinolatos (ROMERO et al., 2014). Encontramos uma glutatona S-transferase somente nas

folhas LI, enquanto que Buffon et al. (2016) identificaram esta mesma proteína e outra semelhante (*Glutathione S-transferase, C-terminal*) em folhas de arroz EI. Ainda no trabalho de Buffon et al. (2016), além das duas glutathionas, foram encontradas mais duas proteínas com função antioxidante (*Oxidoreductase, aldo/keto reductase* e *Leucoanthocyanidin reductase*). Em contrapartida, nas folhas LI, a combinação de uma glutathione S-transferase e três peroxidases parece não ser eficaz para evitar o acúmulo de ERO's, como confirmado nas análises histoquímicas (Figura 3). Assim, o que se consegue ver aqui é que mesmo apresentando diversas possíveis estratégias de defesa, as plantas de arroz utilizadas em nosso estudo não conseguiram se defender do ataque do ácaro *S. oryzae*.

Algo que teria sido bastante válido e acrescentaria muito ao nosso trabalho, mas que acabamos não avaliando, são os parâmetros agronômicos. Se o tivéssemos feito, poderíamos confirmar que ao tentar se defender dos danos causados pela infestação dos ácaros, nossas plantas acabaram sofrendo redução de tamanho, número de sementes viáveis, peso das sementes, entre outras características deletérias. Também encontramos dificuldades ao enviar este segundo artigo para publicação, pois a proteômica não era mais uma novidade, já que havia sido utilizada no artigo anterior (BUFFON et al., 2016). Assim, foi mais complicado provar que este trabalho tinha importância científica, tanto quanto o primeiro.

De qualquer forma, ao concluir, sabemos que fornecemos aqui um conjunto de dados de alta qualidade referente a proteínas diferencialmente expressas em folhas de arroz infestadas com o ácaro fitófago *S. oryzae*. Os esforços futuros agora devem ser concentrados na aplicabilidade biotecnológica dos dados aqui apresentados. Na continuidade do trabalho buscaremos identificar cultivares de arroz que apresentam níveis contrastantes de resistência ou tolerância ao ácaro, para que possamos entender mais a fundo os mecanismos que levam à resistência ou susceptibilidade. A longo prazo, pretendemos desenvolver plantas de arroz geneticamente modificadas com uma maior expressão de inibidores de protease, por exemplo, sendo assim mais eficientes na sua defesa. Podemos ainda criar maneiras de evitar que essas plantas sofram uma degradação tão acentuada de suas proteínas, ou tanta interferência no processo de tradução. Isso poderia evitar que proteínas importantes para o bom desenvolvimento da cultura do arroz sejam inibidas devido ao estresse. O objetivo principal é gerar plantas resistentes ou

tolerantes, ou pelo menos impedir que a população de ácaros aumente ao ponto de causar danos econômicos devido a perdas na produtividade.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. **Rice proteomics: A move toward expanded proteome coverage to comparative and functional proteomics uncovers the mysteries of rice and plant biology.** *Proteomics*, 2011, v. 11, n. 9, p. 1630–1649.
- AGROLINK. 2015. Disponível em:
< https://www.agrolink.com.br/culturas/milho/noticia/pragas-causam-perdas-de-ate-r--55-bilhoes-a-agricultura-no-brasil_220429.html >. Acesso em: 12 set. 2017.
- AGUT, B. et al. ***Tetranychus urticae*-triggered responses promote genotype-dependent conspecific repellence or attractiveness in citrus.** *New Phytologist*, 2015, v. 207, n. 3, p. 790-804.
- AHMADI, N. et al. **The roots of future rice harvests.** *Rice*, 2014, v. 7, n. 1, p. 29.
- ALBA, J. M. et al. **Avoidance and suppression of plant defenses by herbivores and pathogens.** *Journal of Plant Interactions*, 2011, v. 6, n. 4, p. 221-227.
- ALMAGUEL, L. et al. **Evaluación del comportamiento del ácaro *Steneotarsonemus spinki* (Acari: Tarsonemidae) en los estudios de regionalización desarrollados en Cuba.** *Fitosanidad*, 2000, v. 4, n. 3194, p. 15-20.
- ARAÚJO, A. H.; FONSECA, M. E. de N.; BOITEUX, L. S. **Nucleotide diversity of a major carotenoid biosynthetic pathway gene in wild and cultivated *Solanum* (Section *Lycopersicon*) species.** *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2007, v. 19, n. 3, p. 233-237.
- BALMER, D.; PLANCHAMP, C.; MAUCH-MANI, B. **On the move: induced resistance in monocots.** *Journal of Experimental Botany*, 2013, v. 64, n. 5, p. 1249-1261.
- BARCELLOS, D. F. et al. **Ocorrência do ácaro do arroz, nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 1979, v. 14, n. 2, p. 181-184.
- BLASI, E. A. R. et al. **Alterations in rice, corn and wheat plants infested by phytophagous mite.** *International Journal of Acarology*, 2015, v. 41, n. 1, p. 10-18.
- BUFFON, G. et al. **Physiological and Molecular Alterations Promoted by *Schizotetranychus oryzae* Mite Infestation in Rice Leaves.** *Journal of Proteome Research*, 2016, v. 15, n. 2, p. 431–446.
- CHEMIN, B. F. **Manual da Univates para trabalhos acadêmicos: planejamento, elaboração e apresentação.** Univates, 2015. Disponível em:
<www.univates.br/biblioteca>. Acesso em: 11 dez. 2017.
- CHO, M. R. et al. **A new records of tarsonemid mite, *Steneotarsonemus spinki* (Acari, Tarsonemidae) and its damage on rice in Korea.** *Korean Journal Applied*

Entomology, 1999, v. 38, n. 2, p. 157-164.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252>>. Acesso em: 04 set. 2017.

CONRATH, U. et al. **Priming: getting ready for battle. Molecular Plant-Microbe Interactions.** Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, v. 19, n. 10, p. 1062-1071.

CRUZ, R. P. da et al. **Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants.** Food and Energy Security, 2013, v. 2, n. 2, p. 96–119.

CZERNIEWICZ, P. et al. **Role of phenolic compounds during antioxidative responses of winter triticale to aphid and beetle attack.** Plant Physiology and Biochemistry, 2017, v. 118, p. 529-540.

DAMETTO, A. et al. **Ubiquitination pathway as a target to develop abiotic stress tolerance in rice.** Plant signaling & behavior, 2015, v. 10, n. 9, p. e1057369.

DE OLIVEIRA, E. F. et al. **Herbivores with similar feeding modes interact through the induction of different plant responses.** Oecologia, 2016, v. 180, n. 1, p. 1-10.

DERMAUW, W. et al. **A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*.** PNAS, 2012, v. 110, n. 2, p. 113–122.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de identificação de pragas do arroz.** 1998. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1344498/2767889/manual-de-identificacao-de-pragas-do-arroz.pdf/8145bc4c-8309-4e30-af31-8bc3f4176fa8>>. Acesso em: 12 set. 2017.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fuye4xq602wyiv80166sqf4qsy51i.html>>. Acesso em: 04 set. 2017.

EVARISTO, A. B. et al. **Susceptibility and physiological responses of *Jatropha curcas* accessions to broad mite infestation.** Experimental and Applied Acarology, 2013, v. 60, n. 4, p. 485-496.

FADINI, M. A. M. et al. **Does herbivory of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) induce direct defense in strawberry?** Neotropical Entomology, 2004, v. 33, n. 3, p. 293-297.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. Disponível em: <<http://www.rlc.fao.org/pt/paises/brasil/noticias/producao-mundial-de-cereais-deve-atingir-alta-historica-em-2013/>>. Acesso em: 27 mar. 2016.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

FERLA, N. J.; MORAES, G. J. **Ácaros predadores em pomares de maçã no Rio Grande do Sul**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 1998, v. 27, n. 4, p. 649-654.

FERLA, N. J.; MARCHETTI, M. M.; SIEBERT, J. C. **Acarofauna (Acari) de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.: Aquifoliaceae) no estado do Rio Grande do Sul**. Biociências, 2005, v. 13, n. 2, p. 133-142.

FERLA, N. J.; MARCHETTI, M. M.; GONÇALVES, D. **Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp, Rosaceae) e plantas próximas no estado do Rio Grande do Sul**. Biota Neotrópica, 2007, v. 7, n. 2.

FERLA, N. J.; ROCHA, M. S.; FREITAS, T. F. E. **Fluctuation of Mite Fauna Associated to Rice Culture (*Oryza sativa* L.: Poales, Poaceae) in Two Regions in the State of Rio Grande do Sul, Brazil**. Journal of Agricultural Science and Technology, 2013, v. 3, n. 7B, p. 525.

FLECHTMANN, C. H. W. **On The Morphological Variation On The Aedaeagus Of *Schizotetranychus Oryzae* (Acari, Prost. Tetrn.)**. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1985, v. 42, n. 1, p. 29-32.

GILARDONI, P. A. et al. **SuperSAGE analysis of the *Nicotiana attenuata* transcriptome after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect responses**. BMC Plant Biology, 2010, v. 10, n. 1, p. 66.

GRINBERG, M. et al. **Interaction between cucumber plants and the broad mite, *Polyphagotarsonemus latus*: from damage to defense gene expression**. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2005, v. 115, n. 1, p. 135–144.

HALITSCHKE, R. et al. **Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates**. Plant Physiology, 2003, v. 131, p. 1894–1902.

HEIL, M.; BOSTOCK, R.M. **Induced Systemic Resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences**. Annals of Botany, 2002, v. 89, n. 5, p. 503-512.

HUMMEL, N. A. et al. **The panicle rice mite, *Steneotarsonemus spinki* Smiley, a re-discovered pest of rice in the United States**. Crop Protection, 2009, v. 28, n. 7, p. 547-560.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtml>>. Acesso em: 28 ago. 2017.

JAIMEZ-RUIZ, I. A. et al. **Population Growth and Characterization of Plant**

Injuries of *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae) on Rice. Neotropical Entomology, 2015, v. 44, n. 3, p. 294-300.

JAKAB, G. et al. **β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants.** European Journal of Plant Pathology, 2001, v. 107, n. 1, p. 29-37.

KANT, M. R. et al. **Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants.** Plant Physiology, 2004, v. 135, n. 1, p. 483–495.

KARMAKAR, K. ***Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae) - a yield reducing mite of rice crops in West Bengal, India.** International Journal of Acarology, 2008, v. 34, n. 1, p. 95-99.

KIM, S. T. et al. **Rice proteomics: A model system for crop improvement and food security.** Proteomics, 2014, v. 14, n. 4-5, p. 593–610.

KUS, J. V. et al. **Age-related resistance in Arabidopsis is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*.** The Plant Cell, 2002, v. 14, n. 2, p. 479-490.

LIANG, C. et al. **OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice.** PNAS, 2014, v. 111, n. 27, p. 10013-10018.

LI-BYARLAY, H.; PITTENDRIGH, B. R.; MURDOCK, L. L. **Plant Defense Inhibitors Affect the Structures of Midgut Cells in *Drosophila melanogaster* and *Callosobruchus maculatus*.** International Journal of Insect Science, 2016, v. 8, p. 71.

LORENZATO, D. et al. **Flutuação populacional de ácaros fitófagos e seus predadores associados à cultura da macieira (*Malus domestica* Bork) e efeitos dos controles químico e biológico.** Agronomia Sulriograndense, 1986, v. 22, n. 2, p. 215-242.

LORENZATO, D. **Controle biológico de ácaros fitófagos na cultura da macieira no município de Farroupilha, RS.** Agronomia Sulriograndense, 1987, v. 23, n. 2, p. 167-183.

LORENZATTO, D. et al. **Controle biológico de ácaros da macieira no Rio Grande do Sul.** Revista Brasileira de Fruticultura, 1993.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. **Cold, salinity and drought stresses: An overview.** Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, v. 444, n. 2, p. 139-158.

MAO, C. et al. **A Rice NAC Transcription Factor Promotes Leaf Senescence via ABA Biosynthesis.** Plant Physiology, 2017, v. 174, p. 1747–1763.

MAO, Y. B. et al. **Jasmonate response decay and defense metabolite accumulation contributes to age-regulated dynamics of plant insect resistance.** Nature communications, 2017, v. 8.

MICHIELS, K.; VAN DAMME, E. J.; SMAGGHE, G. **Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins?** Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2010, v. 73, n. 4, p. 193-212.

MITTLER, R. et al. **ROS signaling: the new wave?** Trends in Plant Science, 2011, v. 16, n. 6, p. 300-309.

MORAES, G. J. **Controle Biológico de ácaros fitófagos.** Informe Agropecuário, 1991, v. 15, p. 55-62.

MORAES, G. J.; FLECHTMANN, C. H. W. **Manual de Acarologia - Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil.** Ribeirão Preto: Holos Editora, 2008.

MUTHAYYA, S. et al. **An overview of global rice production, supply, trade, and consumption.** Annals of the New York Academy of Sciences, 2014, v. 1324, n. 1, p. 7-14.

MYERS, N. **The biodiversity crisis and the future of evolution.** Environmentalist, 1996, v. 16, n. 1, p. 37-47.

NACHAPPA, P. et al. **Tomato Spotted Wilt Virus benefits a non-vector arthropod, *Tetranychus urticae*, by modulating different plant responses in tomato.** PLOS ONE, 2013, v. 8, n. 9, p. e75909.

NAVIA, D.; MENDES, M. A. S.; OCHOA, R. ***Steneotarsonemus furcatus* de Leon (Prostigmata: Tarsonemidae) infesting rice crops in Brazil.** International Journal of Acarology, 2006, v. 32, n. 2, p. 219-222.

NIAZI, F. R.; SINGH, J. **Effect of mite *Oligonychus oryzae* infestation on Rice tungro acquisition and transmission by *Nephotettix virescens*.** Indian Phytopathology, 2001, v. 54, n. 3, p. 380-380.

OERKE, E. C. **Crop losses to pests.** The Journal of Agricultural Science, 2006, v. 144, n. 1, p. 31-43.

PEGADARAJU, V. et al. **“Premature Leaf Senescence Modulated by the *Arabidopsis* PHYTOALEXIN DEFICIENT4 Gene Is Associated with Defense against the Phloem-Feeding Green Peach Aphid.”** Plant Physiology, 2005, v. 139, n. 4, p. 1927–1934.

PEROTTI, M. A. et al. **Forensic acarology: an introduction.** Experimental and Applied Acarology, 2009, v. 49, n. 1-2, p. 3-13.

PETANOVIC, R.; KIELKIEWICZ, M. **Plant-eriophyoid mite interactions: cellular biochemistry and metabolic responses induced in mite-injured plants. Part I.** Experimental and Applied Acarology, 2010, v. 51, n. 1-3, p. 61-80.

PIETERSE, C. M. J. et al. **Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada.** Revisão Anual de Patologia de Plantas, 2005, v. 13, p. 277-319.

PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. **Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros.** Química Nova, 2013, v. 36, p. 1395-1405.

RADHAKRISHNAN, V.; RAMARAJU, K. **Development durations, colonization and insecticide efficacy of leaf mite, *Oligonychus oryzae* Hirst on rice.** Tropical Agricultural Research, 2009, v. 21, n. 1, p. 30-38.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. **Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants.** Plant, Cell & Environment, 2002, v. 25, n. 2, p. 141–151.

ROMERO, L. C. et al. **Cysteine and cysteine-related signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*.** Molecular Plant, 2014, v. 7, n. 2, p. 264-276.

ROSSETO, C.J. et al. **Pragas do Arroz no Brasil.** In: Contribuições técnicas da delegação brasileira a 2ª Reunião do Comitê do Arroz da Comissão Internacional do Arroz da F.A.O., M.A./DNPEA, 1971, p.149-238.

SAKURABA, Y. et al. **Rice ONAC106 inhibits leaf senescence and increases salt tolerance and tiller angle.** Plant and Cell Physiology, 2015, v. 56, n. 12, p. 2325-2339.

SCHMIDT, R. A. **Leaf structures affect predatory mites (Acari: Phytoseiidae) and biological control: a review.** Experimental and Applied Acarology, 2014, v. 62, n. 1, p. 1-17.

SCHMITT, F. J. et al. **Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress- signaling in phototrophic organisms.** Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics, 2014, v. 1837, n. 6, p. 835-848.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. **Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens.** Advances in Botanical Research, 1997, v. 26, p. 135-192.

SINDARROZ. Cultivo. 2007. Disponível em:
<http://www.sindarroz-sc.com.br/default.php?pg=conteudo_2010&area=Cultivo>.
Acesso em: 04 set. 2017.

SMOLIKOVA, G. et al. **Genetic and Hormonal Regulation of Chlorophyll Degradation during Maturation of Seeds with Green Embryos.** International Journal of Molecular Sciences, 2017, v. 18, n. 9, p. 1993.

SOSBAI, Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil.** Pelotas: SOSBAI, 2016.

STRAUSS, S. Y.; ZANGERL, A. R. **Plant-insect interactions in terrestrial**

ecosystems. Plant-animal interactions: an evolutionary approach, 2002, p. 77-106.

SUMIYOSHI, M. et al. **Increase in cellulose accumulation and improvement of saccharification by overexpression of arabinofuranosidase in rice.** PLoS One, 2013, v. 8, n. 11, p. e78269.

TAN, Y. et al. **Overexpression of MpCYS4, a phytolectin gene from *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh., delays natural and stress-induced leaf senescence in apple.** Plant Physiology and Biochemistry, 2017, v. 115, p. 219-228.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. **The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins.** Physiological and Molecular Plant Pathology, 1999, v. 55, n. 2, p. 85-97.

VET, L. E. M. **Evolutionary aspects of plants carnivore interactions.** Novartis Foundation Symposia, 1999, v. 223, p. 3-20.

WARD, E. R. et al. **Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance.** The Plant Cell, 1991, v. 3, n. 10, p. 1085–1094.

WATANABE, H. et al. **Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains).** Journal of Biological Chemistry, 1991, v. 266, n. 25, p. 16897-16902.

WIT, P. J. G. M. **Visions & reflections (minireview) - How plants recognize pathogens and defend themselves.** Cellular and Molecular Life Sciences, 2007, v. 64, n. 21, p. 2726 – 2732.

WORRALL, D. et al. **Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens.** New Phytologist, 2012, v. 193, n. 3, p. 770–778.

WU, J.; BALDWIN, I. T. **Herbivory-induced signalling in plants: perception and action.** Plant, Cell & Environment, 2009, v. 32, n. 9, p. 1161-1174.

WU, L. et al. **Go in for the kill: how plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens.** Virulence, 2014, v. 5, n. 7, p. 710–721.

ZHANG, Y.; LUBBERSTEDT, T.; XU, M. **The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens.** Journal of Genetics and Genomics, 2013, v. 40, n. 1, p. 23-35.

ZHOU, Z. et al. **Composition and functional properties of rice.** International Journal of Food Science & Technology, 2002, v. 37, n. 8, p. 849–868.